

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets 6 : <b>C12Q 1/04, 1/24</b>	<b>A1</b>	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 96/29427</b> (43) Date de publication internationale: 26 septembre 1996 (26.09.96)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/00419</p> <p>(22) Date de dépôt international: 20 mars 1996 (20.03.96)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 95/03214 20 mars 1995 (20.03.95) FR</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): DIFFUSION BACTERIOLOGIE DU VAR [FR/FR]; Allée d'Athènes - Zone d'activités, F-83870 Signes (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): CONTANT-PUSSARD, Geneviève [FR/FR]; 4, rue Armand-Silvestre, F-92400 Courbevoie (FR). BOISARD-BEAUPERE, Françoise [FR/FR]; 3, cité Joyeux, F-75017 Paris (FR). MARTINOLI, Jean-Luc [FR/FR]; 2, rue du Tremble, F-92390 Villeneuve-la-Garenne (FR). ROUSSEAU, Alain [FR/FR]; 8, rue du Grand-Veneur, F-75003 Paris (FR).</p> <p>(74) Mandataire: CLISCI, Serge; S.A. Fédit-Loriot et Autres, Conseils en propriété industrielle, 38, avenue Hoche, F-75008 Paris (FR).</p>	<p>(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont requies.</i></p>	

(54) Title: METHOD FOR DETECTING MICROORGANISMS BY SEPARATION AND CULTURE ON A GELLED SYSTEM, GELLED SYSTEM AND ASSAY KIT THEREFOR, AND USE THEREOF IN MICROBIOLOGY

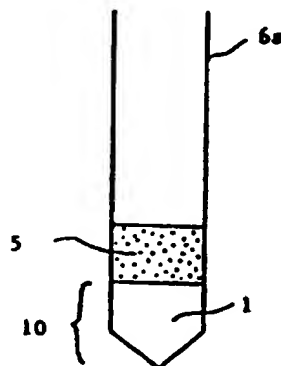
(54) Titre: PROCÉDE DE DETECTION DE MICROORGANISMES PAR SEPARATION ET CULTURE SUR UN SYSTEME GELIFIE, SYSTEME GELIFIE ET NECESSAIRE DE DOSAGE POUR METTRE EN ŒUVRE CE PROCÉDE, UTILISATION EN MICROBIOLOGIE

## (57) Abstract

A method for detecting the presence or absence of microorganisms belonging to the group which consists of bacteria and yeasts in a liquid sample (5) of a biological material. The method comprises placing the liquid sample (5) in a centrifuge tube (6a, 6b) above a gelled system (10) comprising at least (a) a first so-called development phase (1), i.e. a gel comprising a microorganism culture medium and a reagent for inducing a detectable optical measurement change in the presence of microorganisms, said gel being an intimate mixture of water and water-absorbing polymeric particles that have swelled in such a way that, in said intimate mixture, said polymeric particles have (α) a dry weight concentration of 0.05-0.2 g/ml, and (β) a swollen-state diameter of 90-320 μm, the water in the intimate mixture being at least partially provided by said culture medium; centrifuging; and revealing the presence or absence of microorganisms in said liquid sample (5) at said first phase (1) of the gelled system (10) by means of said reagent inducing a detectable optical measurement change.

## (57) Abrégé

La présente invention a trait à un procédé de détection de la présence ou de l'absence de microorganismes appartenant à l'ensemble des bactéries et des levures dans un échantillon liquide (5) d'un matériau biologique; ce procédé comprend l'introduction de l'échantillon liquide (5) dans un tube de centrifugation (6a, 6b) au-dessus d'un système gélifié (10) qui comporte au moins (a) une première phase (1), dite de révélation, qui est un gel comportant un milieu de culture de microorganismes et un réactif induisant une variation de mesure optique détectable en présence de microorganismes, ledit gel étant un mélange intime d'eau et de particules polymériques absorbant l'eau, qui ont été gonflées de telle façon que dans ledit mélange intime lesdites particules polymériques aient (α) une concentration en poids sec comprise entre 0,05 et 0,2 g/ml et (β) un diamètre à l'état gonflé compris entre 90 et 320 μm, l'eau dudit mélange intime provenant en totalité ou en partie dudit milieu de culture; la centrifugation; puis la révélation de la présence ou de l'absence de microorganismes dans ledit échantillon liquide (5) au niveau de ladite première phase (1) du système gélifié (10), par ledit réactif induisant une variation de mesure optique détectable.



### UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brsil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LJ	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

**PROCEDE DE DETECTION DE MICROORGANISMES PAR  
SEPARATION ET CULTURE SUR UN SYSTEME GELIFIE, SYSTEME  
GELIFIE ET NECESSAIRE DE DOSAGE POUR METTRE EN OEUVRE  
CE PROCEDE, UTILISATION EN MICROBIOLOGIE**

5

***Domaine de l'invention***

La présente invention a trait à un nouveau procédé pour détecter  
10 la présence ou l'absence de microorganismes appartenant à l'ensemble des  
bactéries et des levures. Ce procédé met en oeuvre une technique de  
séparation, de culture et de révélation sur un même système gélifié.

Elle concerne également ledit système gélifié en tant que produit  
industriel nouveau, d'une part, et le nécessaire, kit ou trousse de dosage  
15 permettant de mettre en oeuvre ledit procédé, d'autre part.

Elle concerne enfin l'utilisation dudit procédé et dudit système  
gélifié en microbiologie (notamment en bactériologie ou mycologie), en  
particulier dans le domaine de la détection des infections bactériennes (plus  
particulièrement celle des infections urinaires et des septicémies).

20 ***Art antérieur***

Quand on veut apprécier la présence ou l'absence de  
microorganismes tels que les bactéries et les levures, notamment selon une  
méthode colorimétrique, on doit tenir compte des résultats suivants :

- les vrais positifs (TP),
- 25 - les faux positifs (FP),
- les vrais négatifs (TN), et
- les faux négatifs (FN).

D'un point de vue pratique, à partir des résultats TP, FP, TN et  
FN théoriquement possibles, quatre valeurs (exprimées en pourcentages) ont  
30 été définies, à savoir :

- la sensibilité (Sen),
- la spécificité (Spe),
- la valeur prédictive positive (PPV), et
- la valeur prédictive négative (NPV),
- 35 telles que :

$$\begin{aligned}\text{Sen} &= 100.\text{TP}/(\text{TP} + \text{FN}), \\ \text{Spe} &= 100.\text{TN}/(\text{TN} + \text{FP}), \\ \text{PPV} &= 100.\text{TP}/(\text{TP} + \text{FP}), \text{ et} \\ \text{NPV} &= 100.\text{TN}/(\text{TN} + \text{FN}),\end{aligned}$$

- 5 pour évaluer le caractère significatif ou la pertinence des mesures.

On sait que l'on a déjà préconisé ou utilisé une technique de détection ou de filtration colorimétrique pour apprécier la présence ou l'absence de bactéries dans l'urine, d'une part, et une technique de séparation sur gel pour mettre en évidence des agglutinats érythrocytaires, d'autre part.

En ce qui concerne la détection colorimétrique, on connaît de la publication EP-A-0 496 409 un procédé de révélation de bactéries Gram-négatif. Ce procédé comprend la filtration d'un échantillon biologique (notamment l'urine) contenant des bactéries sur un support poreux (diamètre des pores 0,75-1,2  $\mu\text{m}$ ) pour retenir les bactéries sur ledit support, puis la détection des bactéries Gram-négatif par la réaction de leurs déhydrogénases avec un réactif coloré d'oxydo-réduction (notamment un sel de tétrazolium ou la résazurine) en inhibant au moyen d'un agent caotrope et d'un détergent non-ionique du type alkyl-glucoside les réactions de réduction induites par les bactéries Gram-positif.

En ce qui concerne la technique de filtration colorimétrique, on connaît notamment des tests commercialisés par la société dite VITEK SYSTEMS (Hazlewood, Mo.) sous les nomenclatures de "Bac-T-Screen<sup>®</sup>" (test semi-automatique) et de "FiltracCheck<sup>®</sup>-UTI" (test manuel).

La mise en oeuvre de ces tests comprend la filtration d'un échantillon d'urine sur un filtre en papier imprégné d'un révélateur pour retenir et colorer les bactéries éventuellement présentes dans l'échantillon ; la filtration est réalisée avec une différence de pression, aussi un appareillage relativement compliqué est requis ; la principale source d'erreurs (résultats FP et FN) est due à la présence possible dans l'urine d'un grand nombre d'érythrocytes, de leucocytes et/ou de cellules épithéliales (la présence d'érythrocytes et/ou de leucocytes dans l'urine est déjà en soi un signe de dysfonctionnement).

Selon la littérature, voir à cet effet (a) les pages 272 (tableau 3) et 274 (chapitre "Colorimetric Filtration") de l'article de M. PEZZLO, *Clin.*

*Microbiol. Rev.*, 1988, 1 (No 2), 268-280, et (b) la page 86 (alinéa "Système coloration filtration" et tableaux) de l'article de F.W. GOLDSTEIN, *Méd. Mal. Infect.*, 1991, 21, 83-88, les tests Bac-T-Screen® et FiltraCheck®-UTI sont (i) rapides (1-2 minutes), (ii) efficaces quand la population bactérienne est  $\geq 10^5$  CFU/ml, mais (iii) insatisfaisants quand ladite population bactérienne est inférieure à  $10^5$  CFU/ml. Globalement pour l'ensemble de ces deux tests on a selon les deux articles précités, lors de screenings urinaires, pour des populations bactériennes  $\geq 10^5$  CFU/ml : Sen = 93-95%, Spe = 76-77%, PPV = 32%, et NPV = 97-99% ;  $\geq 10^4$  CFU/ml : Sen = 85-89%, Spe = 81%, et NPV = 84-86% ; et  $\geq 10^3$  CFU/ml : Sen = 76-84%, et NPV = 67-72%.

Il existe donc un besoin d'améliorer la fiabilité des mesures pour des populations bactériennes inférieures à  $10^5$  CFU/ml.

En ce qui concerne la technique de séparation sur gel des érythrocytes pour apprécier l'agglutination érythrocytaire on connaît les publications FR-A-2 577 321 et EP-A-0 454 509.

Selon FR-A-2 577 321, la formation ou la présence d'agglutinats érythrocytaires sont mises en évidence par (1) dépôt d'un milieu liquide contenant des érythrocytes sur un gel (i) disposé dans un tube de centrifugation à fond conique, et (ii) laissant passer les globules libres plus facilement que les agglutinats [notamment un gel commercialisé sous le nom de "Sephadex® G 100 Ultrafine" par la société dite PHARMACIA FINE CHEMICAL (Uppsala, Suède)], puis (2) centrifugation douce.

Selon EP-A-0 454 509, on opère de façon sensiblement analogue par centrifugation douce en remplaçant le gel de FR-A-2 577 321 par un système gélifié constitué par un mélange de deux gels de dextrane (voir notamment page 3 lignes 2-4 et page 4 lignes 6-7 de EP-A-0 454 509) : le produit "Sephadex® G 100 Ultrafine" précité qui, à l'état sec, se présente sous la forme de particules ayant un diamètre de 20 à 50  $\mu\text{m}$ , et le produit : "Sephadex® HP Ultrafine" qui, à l'état sec, se présente sous la forme de particules ayant un diamètre de 13 à 23  $\mu\text{m}$ .

Eu égard aux indications fournies dans EP-A-0 454 509 (page 3 lignes 2-4 et 42-43, et page 4 lignes 14-15), il semble clair que le système gélifié de EP-A-0 454 509 ne comporte qu'une seule phase.

Telle que décrite dans FR-A-2 577 321 et EP-A-0 454 509, la technique de séparation sur gel par centrifugation n'est pas directement transposable à la détection de la présence ou l'absence de microorganismes. En particulier les gels préconisés, à savoir les produits "Sephadex® G 100 Ultrafine" et "Sephadex® HP Ultrafine", ne permettent pas le passage des microorganismes tels que les bactéries et les levures lors de la centrifugation douce [i.e. selon l'art antérieur : une intensité inférieure ou égale à 1500 g, en particulier une intensité inférieure à 1000 g (notamment de l'ordre de 400-500 g, EP-A-0 454 509 signalant, page 4 ligne 49, une intensité de 430 g)] ni la séparation des bactéries des autres cellules.

#### ***But de l'invention***

Selon l'invention on se propose de fournir une nouvelle solution technique pour détecter dans un échantillon d'un matériau biologique la présence ou l'absence de microorganismes appartenant à l'ensemble des bactéries et des levures, cette nouvelle solution technique donnant des résultats plus fiables pour des populations microbiennes inférieures à  $10^5$  germes/ml (dans ce qui suit on considérera par commodité que 1 bactérie/ml ou 1 levure/ml correspond approximativement à 1 CFU/ml) que les tests "Bac-T-Screen®" et "FiltracCheck®-UTI" précités relatifs à l'évaluation des infections urinaires bactériennes.

Cette nouvelle solution technique met en oeuvre une technique particulière de séparation des microorganismes sur un système gélifié contenant un milieu de culture, qui est différente de celle proposée par les publications FR-A-2 577 321 et EP-A-0 454 509 précitées, et qui évite de mettre en oeuvre l'isolement des microorganismes sur un système gélosé standard ou la mise en culture nécessaire à leur multiplication, avant centrifugation.

#### ***Objet de l'invention***

Ce but est obtenu en faisant appel à un système gélifié qui sépare sélectivement les microorganismes éventuellement présents dans un échantillon d'un matériau biologique des autres composants notamment les cellules, les peptides et les protéines, d'une part, et qui permet la pousse desdits microorganismes *in situ* pendant la centrifugation puis le cas échéant après ladite centrifugation et leur révélation, d'autre part.

Selon un premier aspect de l'invention, on préconise un nouveau procédé de détection de la présence ou de l'absence de microorganismes appartenant à l'ensemble des bactéries et des levures dans un échantillon liquide d'un matériau biologique susceptible de contenir des cellules autres  
5 que celles desdits microorganismes, ledit procédé, qui met en oeuvre une technique de séparation sur gel, étant caractérisé en ce qu'il comprend les étapes consistant à :

- (1°) faire appel à un système gélifié qui (i) sépare en fonction de leur taille les microorganismes, éventuellement présents dans ledit échantillon  
10 liquide et qui proviennent dudit matériau biologique, des autres composants solides que peut contenir ledit échantillon liquide, (ii) est essentiellement imperméable à l'eau pouvant être présente dans ledit échantillon liquide et aux substances dissoutes éventuellement présentes dans ledit échantillon liquide, et (iii) comporte au moins  
15 (a) une première phase, dite de révélation, qui est un gel comportant un milieu de culture de microorganismes et un réactif induisant une variation de mesure optique détectable en présence de microorganismes, ledit gel étant un mélange intime d'eau et de  
20 particules polymériques absorbant l'eau, qui ont été gonflées de telle façon que dans ledit mélange intime lesdites particules polymériques aient une concentration en poids sec comprise entre 0,05 et 0,2 g/ml et un diamètre à l'état gonflé compris entre 90 et 320  $\mu\text{m}$ , l'eau dudit mélange intime provenant en totalité ou en partie dudit milieu de culture ;
- 25 (2°) introduire ledit échantillon liquide dans un tube de centrifugation au-dessus dudit système gélifié préalablement disposé dans ledit tube de centrifugation ;
- (3°) centrifuger le contenu dudit tube résultant ; et,
- 30 (4°) révéler la présence ou l'absence de microorganismes dans ledit échantillon liquide provenant dudit matériau biologique, au niveau de ladite première phase du système gélifié, par ledit réactif induisant une variation de mesure optique détectable.

Si les microorganismes sont à une concentration trop faible dans ledit échantillon liquide, la révélation de l'étape (4°) intervient après  
35 multiplication des microorganismes dans ledit milieu de culture, à une



température comprise entre la température ambiante et 45°C, en au plus 24 h (de préférence en 1-2 h) pour les bactéries et en au plus 36 h (de préférence en 24-30 h) pour les levures.

Selon un second aspect de l'invention, on préconise, en tant que  
5 produit industriel nouveau, ledit système gélifié qui (i) sépare en fonction de leur taille les microorganismes, éventuellement présents dans ledit échantillon liquide et qui proviennent dudit matériau biologique, des autres composants solides que peut contenir ledit échantillon liquide, (ii) est  
essentiellement imperméable à l'eau pouvant être présente dans ledit  
10 échantillon liquide, et (iii) comporte au moins

(a) une première phase, dite de révélation, qui est un gel comportant un milieu de culture de microorganismes et un réactif induisant une variation de mesure optique détectable en présence de  
microorganismes, ledit gel étant un mélange intime d'eau et de  
15 particules polymériques absorbant l'eau, qui ont été gonflées de telle façon que dans ledit mélange intime lesdites particules polymériques aient une concentration en poids sec comprise entre 0,05 et 0,2 g/ml et un diamètre à l'état gonflé compris entre 90 et 320  $\mu$ m, l'eau dudit mélange intime provenant en totalité ou en  
20 partie dudit milieu de culture.

Selon encore un autre aspect de l'invention, on préconise un nécessaire, kit ou trousse de dosage comprenant notamment :

- ledit système gélifié ou les phases le constituant, et
- le cas échéant, des souches de microorganismes de référence lyophilisées  
25 et/ou leurs milieux de culture pour permettre de réaliser des échantillons-étalons.

Selon enfin un autre aspect de l'invention, on préconise l'utilisation dudit procédé et dudit système gélifié en microbiologie, notamment dans (i) la détection des infections bactériennes (en particulier  
30 telles que les infections urinaires et les septicémies), (ii) l'identification des souches de microorganismes, et (iii) l'évaluation de la résistance de souches de microorganismes vis-à-vis des antibiotiques.

*Brève description des dessins*

Les dessins annexés joints en annexe représentent de façon schématique des tubes de centrifugation garnis chacun d'un système gélifié selon l'invention :

- la figure 1 représente un tube de centrifugation, comportant un système gélifié constitué d'une seule phase, à savoir la phase dite de révélation ;
- les figures 2a et 2b représentent un tube de centrifugation comportant un système gélifié constitué de deux phases qui sont, du bas vers le haut, la phase de révélation et la phase de protection, et montré avant (Fig. 2a) et après (Fig. 2b) centrifugation ;
- la figure 3 représente un tube de centrifugation, comportant un système gélifié constitué de deux phases qui sont, du bas vers le haut la phase de révélation et la phase d'absorption ;
- les figures 4a et 4b représentent un système gélifié analogue à celui de la figure 3, qui comporte en outre la phase de protection et est vu avant (figure 4a) et après (figure 4b) centrifugation ;
- la figure 5 représente un tube de centrifugation, comportant un système gélifié constitué de trois phases qui sont du bas vers le haut la phase barrière, la phase de révélation et la phase d'absorption ;
- les figures 6a et 6b représentent un système gélifié analogue à celui de la figure 5, qui comporte en outre la phase de protection et qui est montré avant (figure 6a) et après (figure 6b) centrifugation ;
- les figures 7 et 8 représentent chacun un système gélifié préféré selon l'invention où la phase de révélation a une épaisseur faible ;
- la figure 9 représente une coupe d'un tube de centrifugation selon l'invention pourvu à son fond d'un capillaire ; et,
- la figure 10 représente une vue de face d'un autre tube de centrifugation selon l'invention qui est également pourvu d'un capillaire.

#### **Abréviations**

Par commodité, les abréviations et acronymes suivants ont été utilisés dans le texte de la présente invention :

Ala	alanyle
BT	bleu de tétrazolium
CFU	unité formant colonie (en anglais : "colony-forming unit")
DIC	coagulation intravasculaire disséminée
EDTA	acide éthylènediaminotétraacétique

	FN	faux négatifs (en anglais : "false negatives")
	FP	faux positifs (en anglais : "false positives")
	Hyp	hydroxyprolyle, Hyp représente 3Hyp (3-hydroxyprolyle) et/ou 4Hyp (4-hydroxyprolyle)
5	INT	iodonitrotétrazolium
	Leu	leucyle
	Lys	lysyle
	MA	4-méthylcoumarinyl-7-amino
	MUG	4-méthylumbelliféryl- $\beta$ -D-glucuronide
10	MW	poids moléculaire
	NA	$\beta$ -naphtylamino
	NADH	nicotinamide-adénine dinucléotide hydrogéné
	NBT	nitrobleu de tétrazolium
	NPV	valeur prédictive négative (en anglais : "negative predictive value")
15	NTC	chlorure de néotétrazolium
	OM	mesure optique
	Phe	$\alpha$ -phénylalanyle
	Phg	$\alpha$ -phénylglycyle
	pNA	p-nitroanilino
20	PPV	valeur prédictive positive (en anglais : "positive predictive value")
	Pro	prolyle
	RT	température ambiante (15-20°C)
	Sen	sensibilité (en anglais : "sensitivity")
	Spe	spécificité (en anglais : "specificity")
25	TN	vrais négatifs (en anglais : "true negatives")
	TP	vrais positifs (en anglais : "true positives")
	TTC	chlorure de triphényltétrazolium
	YNB	source d'azote commercialisée sous la nomenclature commerciale "YEAST NITROGEN BASE"

30 *Description détaillée de l'invention*

Par "matériau biologique" on entend ici :

- un liquide corporel humain ou animal, qui est aqueux, notamment l'urine, le sang, le plasma, le liquide rachidien, le liquide pleural, le lait ;

- une eau quelconque, notamment l'eau vive (sources, rivières), l'eau stagnante (mares, réservoirs, piscines), l'eau industrielle (eau du robinet, eau des canalisations et circuits intervenant en particulier en tant que fluide thermique ou énergétique, eau usée), l'eau de boisson ;
- 5 - une boisson, notamment d'origine agro-alimentaire et à base d'eau telle que les jus de fruits, les sodas, le lait précité, le vin, la bière ;
- un aliment d'origine animale et/ou végétale ou une préparation alimentaire ;
- un extrait de plante notamment un extrait aqueux, alcoolique ou hydroalcoolique, en particulier un jus de pression ou un extrait aqueux ;
- 10 - un produit solide ou visqueux, tel que notamment le pus, les biopsies, les fèces, le crachat, la salive, une plante, une partie de plante, un sol, le sable, ledit produit pouvant contenir ou non de l'eau dans sa composition ; et,
- 15 - d'une manière générale, l'environnement de l'homme (notamment le sol et l'eau précités, d'une part, et l'atmosphère ambiante, d'autre part) ; des exemples sont donnés ci-après pour l'évaluation de la qualité bactériologique et mycologique de l'atmosphère des blocs opératoires.

20 En bref, ledit matériau biologique sera choisi parmi l'ensemble constitué par les liquides corporels, les aliments, les boissons et les produits de l'environnement (y compris les plantes et leurs extraits).

En pratique, il est recommandé mais non essentiel que ledit matériau biologique soit un produit aqueux ; il suffit pour mettre en oeuvre  
25 le procédé de détection de l'invention de façon optimale que ledit matériau biologique soit transformé (notamment par broyage, dilacération, extraction et/ou addition d'eau) en un échantillon liquide ou soit déjà sous forme liquide pour être testé. De façon avantageuse ledit échantillon liquide sera un échantillon aqueux liquide.

30 Par "cellule" on entend ici toute cellule biologique qui n'est pas une bactérie ni une levure. Par "matériau cellulaire" on entend ici un matériau choisi parmi (i) les cellules, (ii) les fragments desdites cellules (notamment les fragments de paroi cellulaire), (iii) le contenu desdites cellules logé à l'intérieur de la paroi et (iv) leurs mélanges.

Le matériau biologique selon l'invention, dans lequel on veut déterminer la présence ou l'absence de microorganismes, et son échantillon liquide peuvent contenir un matériau cellulaire.

A titre d'information, l'urine d'un patient peut contenir :

- 5 (A) des microorganismes en cas d'infection urinaire, tels que :
- les bactéries Gram-négatif, notamment les *Escherichia coli*, *Klebsiella* (en particulier *Klebsiella aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*), *Proteus* (en particulier *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*), *Pseudomonas* (en particulier *Pseudomonas aeruginosa*), *Serratia* (en particulier *Serratia marcescens*)
  - 10 et/ou *Enterobacter* (en particulier *Enterobacter aerogenes*),
  - les bactéries Gram-positif, notamment les *Staphylococcus* (en particulier *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*), *Streptococcus* (en particulier *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus faecium*), *Enterococcus* et/ou *Corynebacterium*, et/ou
  - 15 - les levures notamment les *Candida albicans*, *Candida glabrata* (ancienne nomenclature : *Torulopsis glabrata*), *Candida tropicalis* et/ou *Candida krusei*,
- qui sont susceptibles d'être pathogènes (ces souches peuvent induire des septicémies et des DIC), d'une part ; et,
- 20 (B) un matériau cellulaire comprenant des cellules (en particulier érythrocytes, leucocytes et/ou cellules épithéliales), des enzymes cellulaires (en particulier urokinase urinaire, leucocyte estérase et/ou phosphatase), des antibiotiques pouvant perturber ou fausser la détection des microorganismes présents dans l'urine), des peptides, des protéines, des pigments et/ou des
- 25 fragments de paroi cellulaire, d'autre part.

Selon l'invention, on va faire migrer, à travers le système gélifié, les particules non dissoutes dans l'échantillon liquide dudit matériau biologique, de façon à séparer en fonction de leur taille les microorganismes des autres composants solides et non dissous provenant dudit matériau

30 biologique par centrifugation, d'une part, puis on va en général faire pousser *in situ* lesdits microorganismes, d'autre part, afin de les détecter.

Par "réactif induisant une variation de mesure optique détectable" (autre nomenclature : "réactif colorimétrique"), on entend ici un produit qui, en présence d'un microorganisme appartenant à l'ensemble des bactéries et

35 des levures, provoque une variation de OM appréciée soit à l'oeil nu soit au

moyen d'un colorimètre. En d'autre terme le réactif changeant de couleur en présence de microorganismes induit un changement de couleur dans le spectre visible ou un changement de fluorescence ou de luminescence notamment dans le domaine UV.

- 5 Un tel "réactif colorimétrique" peut-être (i) un indicateur coloré de pH, tel que le rouge de phénol, (ii) un indicateur coloré d'oxydo-réduction, tel que notamment le dichloroindophénol, la résazurine ou un sel de tétrazolium (par exemple BT, INT, NBT, NTC ou TTC), (iii) un substrat chromogène, tel que H-L-Ala-pNA, H-L-Leu-pNA, H-L-Phe-pNA, H-L-Pro-pNA, H-L-Lys-pNA, H-L-Hyp-pNA, un substrat fluorogène, tel que H-L-Ala-NA, H-L-Leu-NA, H-L-Phe-NA, H-L-Pro-NA, H-L-Lys-NA, H-L-Hyp-NA, H-L-Ala-MA, H-L-Leu-MA, H-L-Phe-MA, H-L-Pro-MA, H-L-Lys-MA, H-L-Hyp-MA, MUG phosphate, (iv) un substrat clivable par une  
10 osidase des microorganismes telle que la  $\beta$ -D-glucosidase ou mieux la  $\beta$ -D-galactosidase, ou (v) un substrat chimioluminescent, tel un composé de  
15 luciférine.

- Les indicateurs colorés d'oxydo-réduction sont principalement des composés oxydants qui révèlent la présence de microorganismes par réaction avec au moins une substance réductrice provenant desdits microorganismes,  
20 telle que notamment NADH et les déhydrogénases. Le mécanisme est analogue à celui illustré ci-après pour la résazurine :



- 25 Les substrats chromogènes et fluorogènes que l'on préfère selon l'invention, à savoir H-L-Ala-pNA, H-L-Leu-pNA, H-L-Phe-pNA, H-L-Pro-pNA, H-L-Lys-pNA, H-L-Hyp-pNA, H-L-Ala-NA, H-L-Leu-NA, H-L-Phe-NA, H-L-Pro-NA, H-L-Lys-NA et H-L-Hyp-NA sont clivés par les aminopeptidases produites par les microorganismes. D'autres substrats  
30 peptidiques clivables par lesdites aminopeptidases, qui sont décrits dans la demande PCT publiée WO-A-90/03726, sont également utilisables dans la présente invention.

- Comme indiqué ci-dessus le système gélifié selon l'invention, qui intervient à l'étape (1°) du procédé préconisé, comporte au moins une  
35 couche gélifiée, à savoir la "phase de révélation" également désignée ici par

commodité "première phase" ou "première couche". La phase de révélation est constituée d'une substance polymérique (notamment du type dextrane ou analogue) préalablement gonflée avec de l'eau de façon à former un gel retenant dans sa masse (ou au niveau de sa face inférieure pour les plus  
5 grosses particules), lors de la centrifugation, les particules non solubles contenues dans ledit échantillon liquide et ayant une taille se situant entre 0,5 et 8  $\mu\text{m}$ .

Il est important que, à l'état gonflé, ladite substance polymérique de la phase de révélation soit à une concentration en poids sec de 0,05 à 0,2  
10 g/ml (de préférence à une concentration de 0,1 g/ml) et se présente (dans le gel) sous la forme de particules gonflées ayant un diamètre de 90 à 320  $\mu\text{m}$ , pour retenir dans sa masse ou au voisinage de sa face inférieure les bactéries (longueur : 0,5 à 5  $\mu\text{m}$  ; diamètre : 0,1 à 2  $\mu\text{m}$ ) et la majeure partie des levures (diamètre : 5 à 12  $\mu\text{m}$ ) mais ne pas retenir les cellules.

15 De façon pratique, la substance polymérique de la phase de révélation sera préalablement gonflée avec le milieu de culture destiné à la pousse des microorganismes, ledit milieu de culture contenant le réactif colorimétrique précité induisant une variation de OM.

20 Le système gélifié selon l'invention peut en outre comporter pour la mise en oeuvre de l'étape (1°) du procédé préconisé

(b) une seconde phase, dite d'absorption, essentiellement imperméable à l'eau pouvant être présente dans ledit échantillon liquide et aux substances qui y sont dissoutes, qui retient dans sa masse les particules non solubles contenues dans ledit échantillon liquide  
25 et ayant une taille inférieure à 5  $\mu\text{m}$  mais laisse passer les particules ayant une taille supérieure ou égale à 5  $\mu\text{m}$  lors de la centrifugation, et qui est constituée (i) d'un gel ou (ii) de particules de silice ou de silicate ayant une granulométrie inférieure à 0,1  $\mu\text{m}$ , ladite seconde phase reposant sur ladite  
30 première phase, ledit mélange intime étant essentiellement imperméable à l'eau pouvant être présente dans ledit échantillon liquide.

Selon une variante de réalisation, la "phase d'absorption" ou "deuxième phase" ou encore "deuxième couche" est un gel constitué par un  
35 mélange intime d'eau et de particules polymériques absorbant l'eau, qui ont

été gonflées de telle façon que dans ledit mélange intime lesdites particules polymériques aient ( $\alpha$ ) une concentration en poids sec comprise entre 0,2 et 1 g/ml et ( $\beta$ ) un diamètre à l'état gonflé compris entre 160 et 530  $\mu\text{m}$ .

Dans ce cas la phase d'absorption est constituée d'une substance polymérique (notamment du type dextrane ou analogue) préalablement gonflée avec de l'eau de façon à former un gel, comme ladite première phase, mais de façon à retenir dans sa masse (ou au niveau de sa face inférieure pour les plus grosses particules), lors de la centrifugation, les particules non solubles contenues dans ledit échantillon liquide et ayant une taille plus faible se situant entre 0,1 et 0,5  $\mu\text{m}$ , d'une part, et les particules non solubles ne traversant pas ladite première phase (i.e. taille inférieure à 5  $\mu\text{m}$ ), d'autre part.

Selon une autre variante, la phase d'absorption est une couche particulière constituée d'une matière minérale, micronisée de façon à avoir à l'état sec une granulométrie inférieure à 0,1  $\mu\text{m}$ , d'une part, et ne gonflant essentiellement pas en présence d'eau, d'autre part. Cette matière minérale sera avantageusement choisie parmi l'ensemble constitué par la silice (notamment le sable, le quartz ou le verre) et les silicates tels que les aluminosilicates. Parmi les silicates, on recommande plus particulièrement le kaolin qui est une argile non gonflante en présence d'eau.

On a en effet constaté que les substances minérales telles que la silice et le kaolin ayant une granulométrie inférieure à 0,1  $\mu\text{m}$  permettent le passage des microorganismes et retiennent l'eau ainsi que les substances dissoutes susceptibles d'être présentes dans ledit échantillon liquide.

Ainsi la phase d'absorption va empêcher le passage des particules solides non dissoutes dans ledit échantillon liquide telles que l'hémoglobine, les pigments (notamment les pigments urinaires quand on cherche à détecter la présence ou l'absence de microorganismes dans l'urine en cas d'infection urinaire), les enzymes, les inhibiteurs, et va retenir les particules non dissoutes comme les fragments de cellules lysées. A titre d'exemple, ces fragments sont retenus après traitement avec un agent lytique ou en présence d'un agent lytique. Cet agent lytique peut être un détergent tel que la saponine pour la lyse des érythrocytes.

Il est important que, (1) ladite substance polymérique de la phase d'absorption, à l'état gonflé, soit à une concentration en poids sec de 0,2 à



1 g/ml (de préférence à une concentration de 0,35 g/ml) et se présente (dans le gel) sous la forme de particules gonflées ayant un diamètre de 160 à 530  $\mu\text{m}$ , et que (2) les particules minérales telles que la silice et le kaolin micronisés aient un diamètre homogène.

- 5            Quand elle est présente dans ledit système gélifié, ladite seconde phase renferme avantageusement une ou plusieurs substances inhibant les éventuels contaminants ou lysant les cellules (notamment les érythrocytes et/ou les leucocytes) et/ou éliminant les lipides (cas de la clarification des échantillons de lait à tester), qui sont contenus dans ledit échantillon liquide
- 10           provenant dudit matériau biologique et susceptibles d'interférer à l'étape (4°) en réagissant avec ledit réactif induisant une variation de mesure optique détectable en présence de microorganismes.

- Quand ladite seconde phase n'est pas présente dans le système gélifié de l'invention, il est recommandé que la ou lesdites substances
- 15           (inhibitrices, lysantes et/ou éliminantes) soient incluses dans ladite première phase.

          Le système gélifié selon l'invention peut en outre comporter pour la mise en oeuvre de l'étape (1°) du procédé préconisé

- 20           (c) une troisième phase, dite barrière, infranchissable lors de la centrifugation de l'étape (3°), par les microorganismes éventuellement présents, ladite troisième phase étant disposée sous la première phase de telle façon que ladite première phase repose sur ladite troisième phase.

- 25           Ladite troisième phase (ou "troisième couche") est soit une paraffine soit un gel d'une substance polymérique. Quand elle est une paraffine, il s'agit d'une paraffine solide fondant à une température supérieure à la température de multiplication des microorganismes, par exemple :

- 30           - une paraffine fondant à une température supérieure ou égale à 30°C, quand la culture pour la pousse des microorganismes intervenant à l'étape (4°) est réalisée à RT,
- une paraffine fondant à une température supérieure ou égale à 45°C, quand la culture pour la pousse des microorganismes intervenant à l'étape (4°) est réalisée à 37°C, ou

- une paraffine fondant à une température supérieure ou égale à 50-55°C, quand la culture pour la pousse des microorganismes intervenant à l'étape (4°) est réalisée à 45°C.

De préférence, on fera appel à une paraffine fondant à une température supérieure ou égale à 50°C qui sera introduite à l'état fondu dans le tube de centrifugation.

Quand la phase barrière est un gel, ledit gel sera constitué par un mélange intime d'eau et de particules polymériques absorbant l'eau, qui ont été gonflées de telle façon que dans ledit mélange intime lesdites particules polymériques aient ( $\alpha$ ) une concentration en poids sec comprise entre 0,04 et 0,2 g/ml et ( $\beta$ ) un diamètre à l'état gonflé compris entre 30 et 130  $\mu\text{m}$ .

Ledit gel est constitué d'une substance polymérique (notamment du type dextrane ou analogue) préalablement gonflée avec de l'eau de façon à former un gel, comme ladite première phase, mais de façon à retenir dans sa masse ou au niveau de sa face supérieure, lors de la centrifugation, les particules non solubles, contenues dans ledit échantillon liquide et ayant une taille plus importante (i.e. taille supérieure ou égale à 5 ou 8  $\mu\text{m}$ ).

Ainsi la phase barrière va retenir à sa surface supérieure (cas de la paraffine solide) ou dans sa masse (cas du gel) les cellules, notamment les érythrocytes ayant en moyenne une taille de 5-8  $\mu\text{m}$ , les leucocytes ayant en moyenne une taille de 10-12  $\mu\text{m}$ , les cellules épithéliales (en particulier dans le cas de l'urine) ayant en moyenne une taille de 20-50  $\mu\text{m}$ , les cylindres ayant en moyenne une taille supérieure à 40  $\mu\text{m}$ , les cristaux ayant en moyenne une taille de 20-200  $\mu\text{m}$ , les fragments de paroi cellulaire (notamment, lorsque les cellules auront été lysées lors de la traversée, durant la centrifugation, de la première phase ou de l'ensemble deuxième phase/première phase).

De façon pratique, quelle que soit la nature de la phase barrière, les particules solides contenues dans ledit échantillon liquide vont se répartir selon un gradient : les plus petites (i.e. les moins lourdes d'entre elles) au-dessus des plus grandes (i.e. les plus lourdes d'entre elles).

Quand le système gélifié ne comporte pas la phase barrière, il est important que ledit système gélifié soit disposé dans un tube de centrifugation à fond conique (comme envisagé dans les documents FR-A-2 577 321 et EP-A-0 454 509 précités) ou à fond pourvu d'un capillaire. Dans

ce cas, la répartition des particules solides les plus lourdes est réalisée au fond du tube de centrifugation comme indiqué ci-dessus, les micro-organismes étant disposés juste au-dessus des cellules.

Il est important que, à l'état gonflé, ladite substance polymérique  
5 du gel de la phase barrière soit à une concentration en poids sec de 0,04 à 0,2 g/ml (de préférence à une concentration de 0,14 g/ml) et se présente sous la forme de particules gonflées ayant un diamètre de 30 à 130  $\mu\text{m}$ .

Quand la phase barrière est présente dans le système gélifié selon l'invention, ledit système gélifié peut être logé dans un tube de centrifugation  
10 quelconque, notamment un tube à fond rond ou sphérique.

La présence de la phase d'absorption est avantageuse en ce sens qu'elle permet d'éviter que le liquide (principalement l'eau) dudit échantillon liquide soit en contact avec la phase de révélation avant et après la centrifugation.

15 La présence simultanée de la phase d'absorption et de la phase barrière est avantageuse en ce sens qu'elle autorise l'utilisation d'une phase de révélation de faible épaisseur. Par suite les microorganismes présents dans la masse ou au niveau de la face inférieure de ladite phase de révélation seront plus concentrés dans un volume donné et par suite plus facilement  
20 détectables lors de la révélation colorimétrique (soit à l'oeil nu soit au moyen d'un colorimètre).

Le système gélifié selon l'invention qui comprend ladite première phase seule ou associée avec au moins l'une desdites seconde phase et troisième phase est imperméable au liquide dudit échantillon liquide. Lors de  
25 la centrifugation, ledit liquide et les ingrédients qui y sont dissous ne traversent pas ledit système gélifié, en revanche les ingrédients non dissous dans ledit échantillon liquide migrent dans l'épaisseur dudit système gélifié et sont séparés en fonction de leurs tailles comme expliqué ci-dessus.

Le système gélifié selon l'invention peut en outre comporter pour  
30 la mise en oeuvre de l'étape (1°) du procédé préconisé

(d) une quatrième phase, dite de protection, qui (i) est une huile inerte de densité inférieure à celle de l'eau, de préférence une huile de paraffine, (ii) avant centrifugation, repose sur ladite première phase en l'absence de la seconde phase, ou ladite seconde phase  
35 quand celle-ci est présente dans ledit système gélifié, et (iii) après

centrifugation selon l'étape (3°), repose sur l'eau dudit échantillon liquide.

L'huile de la phase de protection est nécessairement inerte vis-à-vis des constituants du système gélifié et des composants de l'échantillon  
5 liquide. On recommande plus particulièrement une huile qui fond à une température inférieure à RT et qui a un point d'ébullition supérieur à 50°C voire supérieur à 55°C. Convient en particulier une huile de paraffine. de façon pratique, on introduira un volume de 0,25 à 1 ml de la phase de protection dans un tube de centrifugation de 5 ml.

10 Selon l'invention, la phase de protection remplit avantageusement deux fonctions : elle évite la déshydratation et la contamination du système gélifié, lors du stockage, d'une part, et elle permet de ne pas dégrader, lors de l'introduction dudit échantillon liquide dans le tube de centrifugation par coulée, la couche dudit système gélifié sur laquelle elle repose, d'autre part.

15 On recommande de façon préférée, à l'étape (1°) de faire appel soit à un système gélifié comprenant, de haut en bas, dans un tube de centrifugation à fond conique :

- ladite quatrième phase,
- ladite seconde phase, et

20 - ladite première phase,

soit à un système gélifié comprenant, de haut en bas, dans un tube de centrifugation à fond rond ou sphérique :

- ladite quatrième phase,
- ladite seconde phase,

25 - ladite première phase, et

- ladite troisième phase,

soit à un système gélifié comprenant, de haut en bas, dans un tube de centrifugation dont le fond est un capillaire :

- le cas échéant, ladite quatrième phase et/ou, ladite seconde phase, et

30 - dans le capillaire, ladite première phase.

La centrifugation de l'étape (3°) est une centrifugation supérieure à 500g et se situant dans l'intervalle de 1000 g à 5000 g (soit approximativement, selon les dispositifs de centrifugation usuels, à une vitesse angulaire de 2200 à 4500 tours/minute). Cette centrifugation a une durée  
35 d'au moins 5 minutes et de préférence une durée de 10 à 30 minutes. De

façon avantageuse, la centrifugation selon l'invention sera réalisée à 2000-4000g pendant 15 minutes.

Ladite centrifugation selon l'invention est en général effectuée à RT. On peut, si cela est requis, réaliser ladite centrifugation à une  
5 température comprise entre RT et 45°C (de préférence entre RT et 37°C), c'est-à-dire à une température analogue à celle de la culture prévue à l'étape (4°) pour la pousse des microorganismes pouvant être présents dans ledit échantillon liquide, mais l'utilisation d'une température supérieure à RT n'est pas essentielle pendant la centrifugation.

10 Quand la phase de protection est présente dans le système gélifié de l'invention, le liquide dudit échantillon liquide migre à travers ladite phase de protection au cours de la centrifugation ; après ladite centrifugation ledit liquide dépourvu des constituants solides non-dissous qui ont également migré se trouve situé entre ladite phase de protection et la phase d'absorption  
15 (si celle-ci est présente) ou la phase de révélation (en l'absence de la phase d'absorption dans ledit système gélifié).

La révélation prévue à l'étape (4°) intervient pendant la centrifugation, d'une part, et le cas échéant après culture des microorganismes à une température comprise entre RT et 45°C, d'autre part. La durée de la  
20 culture requise pour la pousse des microorganismes est en général fonction de la concentration initiale desdits microorganismes (bactéries et/ou levures) dans ledit échantillon liquide.

En pratique, pour un échantillon liquide ayant une concentration initiale en bactéries inférieure au seuil de détection (i.e.  $10^3$  germes/ml), il  
25 faut prévoir une durée de culture d'au plus 24h (de préférence une durée de 1-2h), sauf pour les souches de *Staphylococcus aureus* qui ont une multiplication relativement lente (pour lesdites souches de *Staphylococcus* il faut compter environ 24 h de culture).

Pour un échantillon liquide ayant une concentration initiale en  
30 levures inférieure au seuil de détection (i.e.  $10^3$  germes/ml), il faut prévoir une durée d'au plus 36 h (de préférence une durée de 24-30 h). Pour favoriser la détection desdites levures, il est recommandé d'incorporer un antibactérien tel que décrit dans le document WO-A-90/03726 précité, notamment la gentamycine, dans la phase d'absorption et/ou la phase de

révélation, afin d'inhiber la croissance des bactéries ou de détruire lesdites bactéries.

Le milieu de culture utilisé pour gonfler la phase de révélation comporte une source de carbone, une source d'azote et des oligoéléments, par exemple une peptone (5 à 20 g/l), un sucre (1 à 20 g/l, de préférence 5 g/l), un extrait de levure (1 à 5 g/l) et des vitamines (10 à 20 ml) avec un tampon pour stabiliser le pH à une valeur se situant entre 6,0 et 8,0. Pour les bactéries, ce milieu est constitué par un exemple d'un bouillon coeur-cerveille additionné d'un sucre. Pour les levures ce milieu peut être soit identique à celui des bactéries soit différent, par exemple : un milieu YNB+glucose, un milieu Sabouraud, un milieu YNB+maltose (qui sont décrits dans WO-A-90/03726 précité).

Pour les bactéries Gram-négatif, on utilisera avantageusement comme milieu de culture le bouillon coeur-cerveille+sucre contenant en tant que réactif préféré induisant une variation de mesure optique détectable :

- la résazurine, à la concentration finale de 0,05 g/ml (0,2 mM),
- le rouge de phénol, à la concentration finale d'environ 0,065 g/ml (0,17 mM),
- le substrat chromogène H-L-Ala-pNA, à la concentration finale d'environ 0,50 g/l (2 mM), ou
- le substrat fluorogène H-L-Ala-NA (environ 2 mM),

ce milieu étant tamponné à pH 6,5-8,0 au moyen d'un tampon phosphate ou Tris (0,1 M), et pouvant contenir le cas échéant :

- un activateur appartenant à l'ensemble des cations divalents, notamment  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  ou  $Mn^{2+}$  (par exemple une solution de  $MnCl_2$  ou  $MnSO_4$  à 30 mg/l environ),
- un réactif de diazotation tel que le p-diméthylaminocinnamaldéhyde ou le Fast Blue BB, et/ou
- un ou plusieurs inhibiteurs des réactions parasites liées notamment à la présence d'enzymes dans ledit échantillon liquide à tester (par exemple dans le cas du screening des urines : l'aprotinine pour inhiber l'urokinase urinaire et l'EDTA pour inhiber les phosphatases).

Le ou les inhibiteurs peuvent en pratique être disposés dans la phase de révélation et/ou la phase d'absorption.

Pour les bactéries Gram-positif, on utilisera avantageusement le milieu décrit ci-dessus relativement aux bactéries Gram-négatif avec comme réactif préféré induisant une variation de mesure optique détectable :

- la résazurine à la concentration finale d'environ 0,05 g/ml,
  - 5 - le substrat chromogène H-L-Leu-pNA à la concentration finale d'environ 2 mM, ou
  - le substrat fluorogène H-L-Leu-NA à la concentration finale de 2 mM,
- le pH étant tamponné à 6,0-8,0, ledit milieu pouvant comporter le cas échéant un activateur, un réactif de diazotation et/ou un ou plusieurs
- 10 inhibiteurs comme indiqué ci-dessus.

Pour les levures, on utilisera avantageusement un milieu YNB+sucre tamponné à pH 6,5-8,0, avec comme réactif préféré induisant une variation de mesure optique détectable, le substrat chromogène H-L-Pro-pNA ou un substrat équivalent, un inhibiteur essentiel étant un antibiotique

15 tel que la gentamycine, la streptomycine ou le chloramphénicol pour inhiber la croissance des bactéries. Ledit inhibiteur essentiel peut également être présent dans la phase d'absorption.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention seront mieux compris à la lecture de la description qui va suivre des dessins et d'exemples

20 de réalisation. Bien entendu l'ensemble de ces éléments n'est nullement limitatif mais est donné à titre d'illustration.

Le système gélifié 10 selon l'invention est logé dans un tube de centrifugation à fond conique 6a, à fond sphérique 6b ou à fond pourvu d'un capillaire 6c. Ledit système gélifié 10 comprend au moins une couche, à

25 savoir la phase de révélation 1 qui est un gel préalablement gonflé au moyen d'un milieu aqueux de culture de microorganismes, et le cas échéant une ou plusieurs autres couches, à savoir la phase d'absorption 2 qui est soit un gel préalablement gonflé avec de l'eau et pouvant contenir un ou plusieurs inhibiteurs (tels que l'aprotinine et l'EDTA), soit une couche particulière

30 (silice ou kaolin) micronisée à une granulométrie inférieure à 0,1  $\mu\text{m}$ , la phase barrière 3 qui est un gel préalablement gonflé avec de l'eau ou une couche de paraffine solide dans les conditions de centrifugation et de culture, et/ou la phase de protection 4 qui est une couche de paraffine liquide dans lesdites conditions.

La figure 1 a trait à un système gélifié 10 selon l'invention comportant une seule couche, la phase de révélation 1, logée dans un tube de centrifugation à fond conique 6a. L'échantillon liquide 5 est versé au-dessus de ladite phase de révélation 1. Par centrifugation les particules non  
5 dissoutes dans ledit échantillon liquide migrent dans l'épaisseur de la phase de révélation, en revanche le liquide dudit échantillon liquide 5 et les ingrédients dissous ne traversent pas la phase de révélation. Après ladite centrifugation, les particules les plus grosses qui sont les plus lourdes se trouvent réparties au fond du tube 6a en fonction de leurs tailles, au fond les  
10 cellules et, au-dessus desdites cellules, les microorganismes qui sont situés au voisinage de la partie inférieure de la phase de révélation 1.

Le système gélifié selon la figure 1 donne de bons résultats, cependant il n'est pas totalement satisfaisant en ce sens que le gel de la phase de révélation 1 (i) est au contact dudit échantillon liquide 5 pendant la  
15 centrifugation et la culture, et (ii) peut par suite être dilué par ledit échantillon liquide 5.

Les figures 2a et 2b ont trait au même système gélifié 10 avant (fig. 2a) et après (fig. 2b) centrifugation. Par rapport au système gélifié de la figure 1, le système gélifié des figures 2a et 2b comporte en outre une  
20 couche d'huile (paraffine liquide) constituant la phase de protection. On verse dans le tube 6a la phase de révélation 1 puis la phase de protection 4, procède à une centrifugation (2000-3000 g pendant 10-20 minutes) pour tasser ledit système gélifié 10. On verse ensuite dans le tube 6a échantillon liquide 5 à tester. Ledit échantillon liquide 5 se répartit au-dessus de la phase  
25 de protection 4 (voir figure 2a) avant centrifugation.

Lors de la centrifugation ledit échantillon liquide 5 migre à travers la phase de protection 4 avec les ingrédients solubles qu'il contient. Ses particules solides migrent à travers la phase de révélation 1, les plus lourdes desdites particules se répartissent au fond du tube comme indiqué ci-dessus  
30 pour la figure 1. Après centrifugation, le liquide de l'échantillon liquide 5 est situé entre la phase de protection 4 et la phase de révélation 1 (voir figure 2b).

Le système gélifié des figures 2a et 2b est certes meilleur que celui de la figure 1, il présente néanmoins l'inconvénient d'un contact de



l'échantillon liquide 5 avec la phase de révélation 1 après centrifugation pendant l'étape dite de culture.

La figure 3 a trait à un système gélifié 10 selon l'invention comprenant deux couches : la phase de révélation 1 et la phase d'absorption 2. On verse dans le tube de centrifugation à fond conique 6a la phase de révélation 1 puis la phase d'absorption 2, centrifuge (1000-3000 g pendant 10-20 minutes) pour tasser ledit système gélifié 10. On verse ensuite dans le tube 6a l'échantillon liquide 5 à tester. Ledit échantillon liquide 5 se répartit au-dessus de la phase d'absorption.

10 Lors de la centrifugation de l'étape (3°), les particules solides contenues dans l'échantillon liquide 5 migrent en fonction de leurs tailles à travers la phase d'absorption 2 et/ou la phase de révélation 1, en revanche le liquide dudit échantillon liquide 5 et les ingrédients qui y sont dissous ne traversent pas la phase d'absorption 2.

15 Après la centrifugation de l'étape (3°), on retrouve au fond du tube 6a les particules les plus grosses et lourdes dudit échantillon liquide 5 selon la répartition donnée ci-dessus pour les figures 1 et 2a-2b.

Le fait que la phase de révélation 1 soit isolée du liquide dudit échantillon liquide 5 par la phase d'absorption 2, après la centrifugation de l'étape (3°), d'une part, et que la phase d'absorption 2 absorbe les particules de faible taille, d'autre part, constitue un avantage.

Les figures 4a [avant centrifugation] et 4b [après centrifugation selon l'étape (3°)] ont trait à un système gélifié 10 selon l'invention analogue à celui de la figure 3 mais comportant en plus, dans un tube de centrifugation à fond conique 6a, une couche d'huile (huile de paraffine), à savoir la phase de protection 4. On verse dans le tube 6a la phase de révélation 1, la phase d'absorption 2 puis la phase de protection 4, procède à une centrifugation (1000-3000 g pendant 10-20 minutes) pour tasser ledit système gélifié 10. On verse ensuite dans le tube 6a l'échantillon liquide 5 à tester. Ledit échantillon liquide 5 se répartit au-dessus de la phase de protection 4 (voir figure 4a).

30 Lors de la centrifugation de l'étape (3°) l'échantillon liquide 5 migre à travers la phase de protection 4, et les particules solides qu'il contient migrent également en fonction de leur taille à travers la phase d'absorption 2 et/ou la phase de révélation 1, en revanche le liquide dudit échantillon liquide 5 et les ingrédients qui y sont dissous ne traversent pas la

phase d'absorption 2. Après centrifugation, les particules les plus grosses et les plus lourdes se trouvent réparties au fond du tube 6a comme indiqué plus haut.

La figure 5 a trait à un système gélifié 10 selon l'invention  
5 comportant trois couches, à savoir de bas en haut : la phase barrière 3, la phase de révélation 1 et la phase d'absorption 2, la couche 1 étant un gel, la couche 2 étant soit un gel soit une phase particulière, et la couche 3 étant soit un gel soit une paraffine solide.

Dans un tube à fond sphérique 6b, on verse successivement la  
10 phase barrière 3 (préalablement fondue, si elle est constituée par une paraffine solide à une température de RT à 50-55°C, puis refroidie), la phase de révélation 1 puis la phase d'absorption 2. On procède à une centrifugation (1000-3000 g pendant 10-20 minutes) pour tasser ledit système gélifié 10. On verse ensuite dans le tube 6b l'échantillon liquide 5 à tester. Ledit échantillon  
15 liquide 5 se répartit au-dessus de la phase d'absorption 2 avant la centrifugation de l'étape (3°).

Lors de la centrifugation de l'étape (3°) le liquide dudit échantillon liquide 5 et les constituants dissous qu'il contient ne migrent pas à travers la phase d'absorption 2 ; seules migrent à travers le système gélifié  
20 10 constitué par l'ensemble phase d'absorption/phase de révélation/phase barrière, en fonction de leur taille, les particules solides dudit échantillon liquide 5. Quand la phase barrière 3 est une paraffine solide toutes les particules grosses et lourdes ne traversent pas son épaisseur mais se répartissent en fonction de leur taille au niveau de l'interface phase de  
25 révélation/phase barrière.

La configuration des couches 2, 1 et 3 selon la figure 5 (il en est de même pour le système gélifié des figures 6a et 6b) offre l'avantage de pouvoir diminuer l'épaisseur de la phase de révélation 1 prise en sandwich entre la phase d'absorption 2 et la phase barrière 3 et d'améliorer ainsi la  
30 lecture de la variation de OM soit à l'oeil nu (changement de couleur) soit au moyen d'un colorimètre.

Les figures 6a [avant la centrifugation de l'étape (3°)] et 6b [après la centrifugation de l'étape (3°)] ont trait à un système gélifié 10 selon l'invention, qui est analogue à celui de la figure 5, mais comportant en outre  
35 une couche d'huile 4 (huile de paraffine) constituant la phase de protection.

La répartition des particules solides de l'échantillon liquide 5 s'effectue comme indiqué pour la figure 5, la phase de protection 4 permettant la migration dudit échantillon liquide 5 lors de la centrifugation de l'étape (3°).

Les substances polymériques qui interviennent à l'état gonflé dans 5 les gels (de haut en bas) de la phase d'absorption 2, de la phase de révélation 1 et de la phase barrière 3, sont avantageusement des particules de dextrane. Conviennent en particulier les produits de la gamme Sephadex® G commercialisés par la société dite PHARMACIA FINE CHEMICALS (Uppsala, Suède), à savoir :

- 10 - pour la phase d'absorption 2, le produit G 25C,
- pour la phase de révélation 1, les produits G 25 à G 100 de granulométrie dite grossière à moyenne, tels que G 25M, G 50C, G 50M, G 75 et G 100 (le produit préféré étant G 100),
- pour la phase barrière 3, les produits G 150 à G 200 de granulométrie 15 dite moyenne à superfine, tels que les G 150, G 150S, G 200 et G 200S (les produits préférés étant G 200 et surtout G 200S).

Les caractéristiques de ces produits du type dextrane sont consignées dans le tableau I ci-après.

TABLEAU I

Phase	Gel	(A)	Domaine de fractionnement (MW)	
			(B)	(C)
Absorption	G 25C	100-300	1000-5000	100-5000
Révélation	G 25M	50-150	1500-30000	500-10000
	G 50C	100-300	1500-30000	500-1000
	G 50M	50-150	1500-30000	500-10000
	G 75	40-120	3000-80000	1000-50000
	G100	40-120	4000-150000	1000-100000
Barrière	G 150	40-120	5000-300000	1000-150000
	G 150S	10-40	5000-150000	1000-150000
	G 200	40-120	5000-600000	1000-200000
	G 200S	10-40	5000-250000	1000-200000
<b>Notes :</b> (A) : diamètre en $\mu\text{m}$ des particules à l'état sec (B) : peptides et protéines globulaires (C) : dextrans G 25C : "Sephadex® G 25 Coarse" G 25M : "Sephadex® G 25 Medium" G 50C : "Sephadex® G 50 Coarse" G 50M : "Sephadex® G 50 Medium" G 75 : "Sephadex® G 75" G 100 : "Sephadex® G 100" G 150 : "Sephadex® G 150 Superfine" G 200 : "Sephadex® G 200" G 200S : "Sephadex® G 200 Superfine"				

5

Dans les tableaux II et III ci-après, on a donné pour les gels préférés, les caractéristiques relatives à la granulométrie à l'état gonflé et à la concentration, qui sont importantes selon l'invention.

**TABLEAU II**

Phase	Gel	Diamètre des grains ( $\mu\text{m}$ ) à l'état gonflé	
		(A)	(B)
Absorption	G 25C	160-530	172-516
Révélation	G 100	90-320	103-311
Barrière	G 200S	30-130	32-129
<b>Notes :</b> (A) : domaine de l'invention (B) : domaine préféré			

**TABLEAU III**

5

Phase	Gel	Concentration (g/ml)		
		(A)	(B)	(C)
Absorption	G 25C	0,2	0,35	1
Révélation	G 100	0,05	0,1	0,2
Barrière	G 200S	0,04	0,14	0,2
<b>Notes :</b> (A) : concentration minimale selon l'invention (B) : concentration préférée selon l'invention (C) : concentration maximale selon l'invention				

En se référant aux concentrations minimales et maximales des gels fournis dans le tableau III, il convient de remarquer que :

- 10 (1) si le gel en contact avec le liquide de l'échantillon liquide 5 (i.e. couche 1 de la figure 1 ou couche 2 des figures 3 et 5) est plus concentré, il y a un risque de passage dudit échantillon liquide 5 à travers ledit gel pendant la centrifugation ;
- (2) si tous les gels sont plus concentrés, la détection de la présence ou de l'absence de microorganismes est gravement perturbée ;
- 15 (3) si l'un au moins des gels est plus dilué, on peut avoir des échanges de liquide entre l'échantillon liquide et le gel sous-jacent, d'une part, ou entre deux gels adjacents, d'autre part, ce qui fausse ladite détection.

On peut supprimer la phase barrière 3, comme cela est illustré par les figures 1, 2a-2b, 3 et 4a-4b, lorsque les grosses particules (érythrocytes, leucocytes, autres cellules) n'ont pas d'activité sur le réactif induisant une variation de mesure optique détectable. Cela est notamment le cas quand  
5 ledit réactif est la résazurine.

On peut supprimer la phase d'absorption 2 et la phase barrière 3 comme cela est illustré par les figures 1 et 2a-2b, quand aucune substance (dissoute ou particulaire) présente dans l'échantillon liquide 5 n'a d'activité sur ledit réactif induisant une variation de mesure optique détectable ou  
10 lorsque toute interférence possible peut être inhibée pendant la révélation de l'étape (4°).

Si la concentration des microorganisme, qui sont éventuellement présents dans l'échantillon liquide 5 à tester et qui ont migré lors de la centrifugation de l'étape (3°) pour se trouver dans la phase de révélation 1  
15 (soit dans l'épaisseur de ladite phase 1, soit au-dessus de l'interface phase 1/phase 3 ou phase 1/paroi inférieure du tube 6a), est supérieure au seuil de détection du réactif de la phase de révélation 1 induisant une variation de mesure optique détectable il n'y a pas lieu de procéder à la multiplication des microorganismes par culture *in situ* à l'étape (4°).

En revanche, si après ladite centrifugation la concentration des microorganismes est inférieure au seuil de détection, il est requis d'entreprendre ladite multiplication par culture *in situ* dans le tube de centrifugation au niveau de ladite phase de révélation 1, de préférence à une  
20 température de 37°C.

Le tube de centrifugation 6a, 6b ou 6c est réalisé en un matériau transparent (plastique ou verre). De préférence, le tube de centrifugation utile selon l'invention sera réalisé en plastique et fabriqué par moulage. En variante, ledit tube peut être transparent sur au moins une partie de sa surface périphérique en regard de zone garnie avec la phase de révélation 1.  
25

Selon l'invention, le seuil de détection des microorganismes, rapporté à la concentration initiale desdits microorganismes dans ledit échantillon liquide 5, est de  $10^3$  germes/ml, c'est-à-dire nettement inférieur au seuil de  $10^5$  germes/ml des techniques antérieures illustrées notamment par les tests Bac-T-Screen® et FiltraCheck®-UTI précités.  
30

Cette amélioration est due au fait que, selon l'invention, on ( $\alpha$ ) concentre les microorganismes de l'échantillon liquide 5, qui ont migré lors de la centrifugation, dans la phase de révélation 1, puis ( $\beta$ ) le cas échéant, les fait multiplier dans le milieu nutritif.

- 5 Pour concentrer les microorganismes dans la phase de révélation, il est recommandé selon l'invention de faire appel à une phase de révélation 1 ayant un volume et une épaisseur les plus faibles possibles. Par suite, la forme du tube de centrifugation sera choisie de telle façon que le facteur de concentration des microorganismes, qui est directement proportionnel au
- 10 rapport volume de l'échantillon à tester/volume de la phase de révélation, soit maximal. Le volume de la phase de révélation est déterminé par la formule  $V = \pi R^2 h$  (où  $V$  est exprimé en ml,  $R$  le rayon et  $h$  la hauteur sont exprimés en cm). Plus le diamètre du tube est faible, plus le facteur de concentration augmente. A titre d'exemple, le facteur de concentration peut
- 15 être un multiple de  $10^3$  quand le rayon du tube est divisé par 10.

Le capillaire du tube 6c permet une bonne concentration des microorganismes dans la phase de révélation.

- Les figures 7 et 8 montrent des systèmes gélifiés préférés selon l'invention, tels qu'ils se présentent après centrifugation. Le tube de la figure
- 20 7, qui a un contenu similaire à celui de la figure 4b, comporte une phase de révélation 1 de volume plus faible que ceux de la phase 2 et de l'échantillon 5, qui est logée au fond dudit tube de centrifugation 6a dans la portion inférieure de la partie conique.

- Le tube 6b de la figure 8, qui a un contenu similaire à celui de la figure 6b, présente un fond sphérique (qui peut avoir un diamètre plus petit que celui du reste du tube) où est logé la phase barrière 3 et la phase de
- 25 révélation 1. Ce fond est tel que la phase de révélation 1 prise en sandwich entre la phase barrière 3 inférieure et la phase d'absorption 2 supérieure ait un volume et une épaisseur les plus faibles possibles.

- 30 A titre d'exemple, si on fait appel à un tube en plastique transparent, selon la figure 8, ayant un volume de 12 ml, un diamètre intérieur de 1,35 cm et dans lequel on introduit un volume de 6 ml d'échantillon d'urine à tester, pour obtenir la phase de révélation 1 sous la forme d'un anneau de 0,2 cm de hauteur, il faut que le volume de ladite
- 35 phase 1 à utiliser ait pour valeur de  $V = \pi.(1,35/2)^2.0,2$  i.e., environ

0,3 ml. Le facteur de concentration (F) des microorganismes de l'urine est alors de  $6/0,3 = 20$  pour qu'un anneau coloré soit visible. Comme la réaction positive débute par un point représentant moins du dixième du diamètre du tube, le volume réactionnel utile de la phase de révélation 1 devient alors de 0,003 ml, ce qui conduit à un facteur de concentration de  $6/0,003 = 2000$ , soit une augmentation du seuil de sensibilité du facteur de concentration d'un multiple de  $10^3$  visé ci-dessus. En variante, lorsque la section de la partie inférieure du tube est diminuée d'un facteur 10 (i.e. divisée par 10 ; soit 0,135 cm de diamètre), V devient  $0,3 \times 10^{-2}$  ml, soit une augmentation de  $10^2$  du facteur F pour un anneau et une augmentation de  $10^3$  dudit facteur F pour un point.

Les figures 9 et 10 présentent chacune un tube de centrifugation 6c qui est en matière plastique transparente (par exemple en polystyrène ou polycarbonate) et qui est utile selon l'invention. Le tube 6c offre l'avantage de pouvoir procéder à une numération des microorganismes présents dans la phase de révélation logée dans le capillaire.

Selon la figure 8, le tube 6c est pourvu à son extrémité inférieure d'un capillaire 7 situé le long de l'axe dudit tube et destiné à recevoir la phase de révélation (référéncée 1 ci-dessus). La partie cylindrique du tube 6c est en relation avec l'ouverture du capillaire 7 par l'intermédiaire d'une portion tronconique 20. La phase de révélation est logée dans le tube capillaire jusqu'à la ligne 22 qui correspond à l'intersection du tronc de cône 20 avec l'ouverture du capillaire 7. Au-dessus de la ligne 22 est logée, le cas échéant, la phase de protection (référéncée 4 ci-dessus) et/ou la phase d'absorption (référéncée 2 ci-dessus). La paroi cylindrique extérieure du tube 6c se prolonge vers le bas en regard du capillaire par deux pattes (ou prolongements) 8 et 9 qui sont sensiblement diamétralement opposés et assurent la stabilité du tube quand il est disposé debout. Ces pattes 8 et 9 constituent un socle ; entre elles sont ménagées deux fenêtres permettant d'observer à l'oeil nu ou au moyen d'un dispositif optique (colorimètre, spectromètre, etc.) le contenu du capillaire 7 avant centrifugation, puis après centrifugation ou culture en vue de procéder à la numération des bactéries ou des levures présentes.

Le tube 6c de la figure 10 est réalisé de façon à procéder à la numération des bactéries ou des levures présentes comme indiqué ci-dessus



pour le tube de la figure 9, d'une part, et à recueillir lesdites bactéries ou levures présentes afin de les identifier, d'autre part. Ce tube comporte un capillaire 7, une paroi tronconique 20 et une paroi cylindrique interne 17, l'intersection de la surface 20 avec l'ouverture du capillaire 7 constituant la  
5 ligne 22. L'ouverture de la portion cylindrique 17 vers l'extérieur est soit parallèle à l'axe du tube 6c, soit en forme d'entonnoir comme représenté en 11.

La surface extérieure du tube 6c de la figure 10 comporte au voisinage de l'extrémité supérieure une ou plusieurs gorges 14 et/ou 15 où  
10 peut être logé un joint torique (notamment en caoutchouc) non représenté ici, l'une de ces gorges 14 est disposée entre deux collerettes ou lèvres 12 et 13, une autre de ces gorges 15 est disposée entre la collerette 13 et la surface extérieure 16 du tube. Une butée annulaire 18 est prévue sur ladite surface extérieure 16. L'ensemble collerette 12 et/ou 13 + surface extérieure 16 est  
15 destinée à être obturée par un bouchon cylindrique notamment en matière plastique recouvrant la partie supérieure externe du tube 6c jusqu'à la butée 18. Les pattes ou prolongements 8 et 9 servent de socle pour maintenir debout le tube de centrifugation 6c comme indiqué ci-dessus pour le tube de la figure 9. L'une de ces pattes 8 peut présenter une portion de surface  
20 dirigée vers l'extérieur qui est plane, afin de recevoir le cas échéant, des indications manuscrites ou collées. Les pattes 8 et 9 peuvent également comporter sur leur surface dirigée vers l'extérieur un ensemble de plusieurs gorges 19 et de lèvres 21 alternées, de façon à pouvoir, si cela est nécessaire, logé le tube 6c de la figure 10 (qui peut avoir une hauteur très  
25 petite notamment 30 mm) dans l'ouverture supérieure d'un autre tube de centrifugation (plus grand) convenant au dispositif de centrifugation utilisé.

L'observation et la numération des bactéries ou levures présentes dans la phase de révélation logée dans le capillaire 7 jusqu'à la hauteur de la ligne 22 sont effectuées comme indiqué plus haut pour le tube de la figure 9  
30 au moyen des fenêtres ménagées entre les pattes 8 et 9.

Pour recueillir les microorganismes présents dans la phase de révélation logés dans le capillaire 7 du tube de la figure 10, (1°) on retourne ledit tube pour jeter le surnageant, ladite phase de révélation restant dans le capillaire, (2°) on place un joint torique dans la gorge 14, (3°) on insère  
35 l'ensemble collerette 12 + joint logé dans la gorge 14 + collerette 13 +

surface 16 à l'intérieur de l'ouverture d'un second tube de centrifugation contenant le milieu liquide de récupération, jusqu'à ce que le second tube de centrifugation vienne en contact avec la butée 18, le tube 6c étant maintenu retourné (c'est-à-dire capillaire 7 dirigé vers le haut), (4°) on agite  
5 l'ensemble des deux tubes de centrifugation ainsi raccordés par leurs ouvertures, puis (5°) on centrifuge, à 1000-2000 g, pendant 2-5 minutes, pour faire passer la phase de révélation, initialement contenu dans le capillaire 7, dans le liquide de récupération qui se trouve au fond du second tube.

10 Cette façon de procéder permet la récupération aisée des microorganismes présents sans contamination et sans perte notable. Cette technique est bien plus efficace que celle qui consiste à procéder au prélèvement de la phase de révélation logée dans le capillaire 7 au moyen d'une aspiration avec une seringue ; en effet les particules polymériques  
15 gonflées du gel constituant la phase de révélation ne passent pas facilement à travers l'aiguille de la seringue du fait de leurs dimensions.

En variante, on peut recueillir la majeure partie de la phase de révélation contenant des microorganismes en utilisant le tube de la figure 9. Dans ce but, (1a) on jette le surnageant situé au-dessus de la ligne 22, (2a)  
20 on ajoute une solution aqueuse de lavage, obture le tube 6c et agite, (3a) on centrifuge à 1000-2000 g pendant 2-5 minutes, (4a) on reproduit les opérations (2a) et (3a) jusqu'à ce que le surnageant soit incolore, (5a) on jette le surnageant résultant, ajoute une solution aqueuse de récupération et agite pour recueillir le milieu liquide résultant contenant la majeure partie de  
25 la phase de révélation et par suite des microorganismes présents.

D'un point de vue pratique, pour que la phase de révélation reste dans le capillaire lorsque le tube 6c est retourné avant agitation puis centrifugation, il est important que le diamètre interne du capillaire soit inférieur ou égale à 2,5 mm. Un diamètre interne convenable se situe entre  
30 1,2 et 2,3 mm. On a obtenu de très bons résultats avec des diamètres intérieurs de 2,0 et 2,2 mm.

Pour améliorer la sensibilité de la détection des microorganismes et obtenir une bonne récupération de la phase de révélation, il est recommandé de satisfaire au moins une des conditions suivantes et de  
35 préférence l'ensemble desdites conditions :

- A- le diamètre interne du capillaire est inférieure à 2,5 mm,  
 B- l'angle  $\alpha$  de la portion tronconique 20 est inférieur ou égale à  $30^\circ$  (i.e.  $\leq \pi/6$ ), c'est-à-dire que la génératrice de cette portion tronconique est faiblement inclinée par rapport à l'axe vertical du tube (angle d'inclinaison inférieur ou égale à  $\alpha/2$ ),  
 C- le volume du capillaire est inférieur ou égale à 0,6 ml et de préférence inférieur ou égale à 0,1 ml.

Si la condition B ou la condition C n'est pas satisfaite, il y a un risque de dépôt de traces de phase de révélation sur la paroi interne du tube et par suite de microorganismes, surtout au-dessus du voisinage de l'intersection 22.

#### *Exemple 1*

- Dans un tube de centrifugation en plastique transparent, d'un volume de 5 ml et d'un diamètre intérieur de 1,10 cm on introduit successivement :
- 15 - 0,5 ml d'un gel G 200S/eau distillée, dans lequel G 200S est à une concentration en poids sec de 0,2 g/ml et a une granulométrie à l'état gonflé de 40-100  $\mu\text{m}$ , pour former la phase barrière ;
  - 0,25 ml d'un gel G 100/milieu de culture aqueux, dans lequel G 100 est à une concentration en poids sec de 0,2 g/ml et a une granulométrie à l'état gonflé de 120-300  $\mu\text{m}$ , ledit milieu de culture aqueux ayant la composition suivante :

	bouillon de coeur-cervelle	37 g/l
	glucose	5 g/l
	agarose (type IX)	0,33 g/l
25	pH	$7,4 \pm 0,1$

et contenant 0,05 g/ml de résazurine, pour former la phase de révélation ; et,

- 0,5 ml d'un gel G 25C/eau distillée, dans lequel G 25C est à une concentration en poids sec de 1 g/ml et a une granulométrie à l'état gonflé de 40-110  $\mu\text{m}$ , pour former la phase d'absorption.

On procède à une centrifugation (1000-3000 g pendant 10-20 minutes à RT) pour tasser le système gélifié résultant. En variante, ladite centrifugation de tassage peut être effectuée après l'introduction de chacune desdites phases avant d'introduire la phase suivante.

On dispose d'un système gélifié prêt à l'emploi.

**Exemple 2**

On introduit, au-dessus du système gélifié préparé selon l'exemple 1 ci-dessus, 1 ml d'huile de paraffine en tant que phase de protection.

On obtient ainsi un dispositif pour détecter la présence ou l'absence de microorganismes dans un échantillon d'un matériau biologique, ledit dispositif étant stable au stockage.

**Exemple 3**

Dans un tube de centrifugation en plastique transparent, d'un volume de 5 ml et d'un diamètre intérieur de 1,10 cm, on introduit successivement :

- 0,5 ml de paraffine fondant à une température supérieure ou égale à 50°C (l'introduction de cette paraffine est effectuée à l'état fondu), pour former (après refroidissement jusqu'à RT) la phase barrière ;
- 0,25 ml d'un gel G 100/milieu de culture aqueux, dans lequel G 100 est à une concentration en poids sec de 0,2 g/ml et a une granulométrie à l'état gonflé de 103-311  $\mu\text{m}$ , ledit milieu de culture aqueux ayant la composition suivante :

	bouillon de coeur-cervelle	37 g/l
	glucose	5 g/l
20	agarose (type IX)	0,33 g/l
	pH	7,4 $\pm$ 0,1

et contenant 2 mM de H-L-Ala-NA en tampon phosphate (0,1 M) à pH 8,0, pour former la phase de révélation ; et,

- 0,5 ml d'un gel G 25C/eau distillée dans lequel G 25C est à une concentration en poids sec de 1 g/ml et a une granulométrie à l'état gonflé de 32-129  $\mu\text{m}$ , l'eau distillée utilisée pour élaborer ce gel contenant 0,06 g/ml d'EDTA, pour former la phase d'absorption.

On procède à une centrifugation (1000-3000 g pendant 10-20 minutes à RT) pour tasser le système gélifié résultant. En variante, ladite centrifugation de tassage peut être effectuée après l'introduction de chacune desdites phases avant d'introduire la phase suivante.

On dispose d'un système gélifié prêt à l'emploi.

**Exemple 4**

On introduit, au-dessus du système gélifié préparé selon l'exemple 3 ci-dessus, 0,25 ml d'huile de paraffine en tant que phase de protection.

On obtient ainsi un dispositif pour détecter la présence ou l'absence de microorganismes dans un échantillon d'un matériau biologique, ledit dispositif étant stable au stockage.

#### Exemple 5

- 5 On procède comme indiqué à l'exemple 3 avec la différence que le milieu de culture aqueux utilisé pour le gonflement de G100 en vue d'obtenir la phase de révélation contient en outre un réactif de diazotation, le p-diméthylaminocinnamaldéhyde.

#### Exemple 6

- 10 Dans un tube de centrifugation en plastique transparent ayant un fond conique, un diamètre intérieur (dans sa portion cylindrique) de 1 cm et un volume de 5 ml, on introduit successivement :

- 0,20 ml d'un gel G 100/milieu de culture aqueux, dans lequel G 100 est à une concentration en poids sec de 0,2 g/ml et a une granulométrie à l'état gonflé de 103-311  $\mu\text{m}$ , ledit milieu de culture aqueux ayant la composition suivante :

	YNB	6,7 g/l
	maltose	20,0 g/l
	gentamycine	0,05 g/l
20	cycloheximide	0,5 g/l
	pH	6,0

- et contenant 1 mM de H-L-Pro-pNA (ce milieu de culture contenant un substrat spécifique des souches de *Candida albicans* permettant de distinguer lesdits *Candida albicans* des autres *Candida*), pour former la phase de révélation ; et,

- 0,5 ml de kaolin micronisé et ayant une granulométrie homogène de 0,055-0,060  $\mu\text{m}$ , pour former la phase d'absorption.

On tasse le système gélifié résultant par centrifugation à 2000 g pendant 15 minutes à RT.

- 30 On dispose ainsi d'un système gélifié prêt à l'emploi, qui est spécifiquement destiné à l'identification des *Candida albicans* parmi un ensemble de souches non isolées de *Candida*.

#### Exemple 7

- On introduit au-dessus du système gélifié préparé selon l'exemple 6, 1 ml d'huile de paraffine, pour former la phase de protection et on

centrifuge à 2000 g pendant 15 minutes à RT pour tasser le système gélifié résultant.

**Exemples 8 et 9**

On procède comme indiqué à l'exemple 6 ci-dessus mais en  
5 utilisant comme milieu nutritif 0,20 ml du milieu nutritif de l'exemple 1  
contenant de la résazurine pour l'obtention de la phase de révélation afin de  
préparer un système gélifié spécifique de la détection des bactéries (exemple  
8). A partir du système gélifié ainsi obtenu, on prépare selon l'exemple 7 un  
système gélifié prêt à l'emploi qui est pourvu de la phase de protection  
10 (exemple 9).

**Exemples 10 et 11**

On procède comme indiqué à l'exemple 6 ci-dessus mais en  
utilisant comme milieu nutritif 0,20 ml d'un milieu nutritif spécifique des  
souches d'*Aspergillus* pour l'obtention de la phase de révélation afin de  
15 préparer un système gélifié spécifique de la détection de ces levures  
(exemple 10). A partir du système gélifié ainsi obtenu, on prépare selon  
l'exemple 7 un système gélifié prêt à l'emploi qui est pourvu de la phase de  
protection (exemple 11).

**Exemple 12**

20 On a introduit dans les tubes contenant les systèmes gélifiés  
préparés selon les exemples 1 et 5, un volume de 1 à 4 ml d'urine stérilisée  
(où on a introduit différentes concentrations de souches d'*Escherichia coli*)  
ou d'urine d'un patient atteint d'infection urinaire provoquée par des souches  
d'*Escheridia coli*. Après 20 minutes de centrifugation à 3000-5000 g et à RT  
25 on observe, avec un échantillon d'urine d'infection urinaire contenant des  
souches d'*Escheridia coli* à la concentration de  $10^5$  CFU/ml, un point rose  
avec la résazurine (i.e. système gélifié préparé selon l'exemple 1) et un point  
rouge avec le mélange H-L-Ala-NA/réactif de diazotation (i.e. système  
gélifié préparé selon l'exemple 5). Ces points colorés situés au niveau de la  
30 phase de révélation s'étendent et forment chacun un anneau coloré après  
quelques heures à RT ou 37°C.

Les résultats obtenus avec la résazurine ont été consignés ci-après  
dans le tableau IV.

**TABLEAU IV**  
**Détection de souches d'*Escherichia coli* avec la résazurine**

Lecture	Bactéries/ml en urine d'infection urinaire					
	10 <sup>8</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	≤ 10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>
à t = 0,5 h	+++	+++	+++	++	+	+/-
à t = 2 h	+++	+++	+++	+++	+++	+++

#### 5 Exemple 13

Des essais complémentaires ont été réalisés sur des lots d'urine provenant de 50 personnes (35 personnes étant atteintes d'infection urinaire bactérienne, 15 personnes utilisées pour contrôle ne souffrant pas d'infection urinaire). Les systèmes gélifiés des exemples 1-5 ont été utilisés  
 10 simultanément pour chaque échantillon d'urine testé 2 ml d'urine ont été introduits dans chacun des tubes de centrifugation.

Après centrifugation à 3000-5000 g pendant 15 minutes à RT puis culture *in situ* à 37°C pendant 24 h, on a observé avec ces échantillons d'urine une amélioration des Sen, Spe et NPV (pour de faibles  
 15 concentrations bactériennes) avec les systèmes gélifiés selon l'invention par rapport aux tests Bac-T-Screen® et FiltraCheck®-UTI précités. Une partie des résultats obtenus est consignée ci-après pour une concentration dans les échantillons d'urine de 10<sup>3</sup> bactéries/ml :

Sen = 95-98%  
 20 Spe = 93-97%  
 NPV = 91-94%

#### Exemple 14

Le système gélifié de l'exemple 2 a été utilisé pour apprécier la présence ou l'absence de bactéries dans 8 blocs opératoires. Les tubes (d'un  
 25 volume de 15 ml), garnis dudit système gélifié et pourvus ou non d'une collerette du type entonnoir au niveau de leur orifice supérieur, ont été disposés pendant 24 h dans des blocs opératoires au voisinage des arrivées de gaz, à une hauteur de 1,50 m et à une distance de 1 m du mur le plus proche. Avec une pipette, on a fait couler de l'eau distillée pour rincer la  
 30 partie exposée de chaque tube et de chaque collerette présente. Après centrifugation (30 minutes à 3000 g) et culture *in situ* à 37°C pendant 24 h,

on a pu détecter dans l'un des blocs opératoires la présence de bactéries dans l'atmosphère ambiante (principalement des souches de *Staphylococcus*). Le bloc opératoire contaminé a été stérilisé.

**Exemple 15**

- 5 On a découpé puis finement dilacéré les filtres (membranes cellulosiques) des conduits d'aération de 6 blocs opératoires. Le matériau ainsi obtenu a été trituré avec de l'eau distillée ; le surnageant résultant a été introduit à raison de 1 à 2 ml dans des tubes obtenus selon le procédé des exemples 2 et 11. Après centrifugation à 3000-5000 g pendant 15 minutes à  
10 RT puis culture *in situ* à 37°C pendant 24 h, on a pu détecter dans l'un des six blocs opératoires la présence de bactéries (principalement des souches de *Pseudomonas*) et dans un autre desdits blocs opératoires la présence de levures (dans le cas d'espèce des souches d'*Aspergillus*). Les deux blocs opératoires contaminés ont été stérilisés.

15 **Exemple 16**

Du lait "clarifié" (i.e. délipidé) et stérilisé a été contaminé avec des souches de *Candida* (à une concentration supérieure ou égale à 10<sup>5</sup> germes/ml) et réparti à raison de 2,5 ml dans des lots de tubes de centrifugation (5 tubes par lot) préparés selon le procédé de l'exemple 7 :

- 20 - le lot A contenant des souches isolées de *Candida albicans*,  
- le lot B contenant des souches isolées de *Candida glabrata*,  
- le lot C contenant des souches isolées de *Candida krusei*,  
- le lot D contenant des souches non isolées de divers *Candida* (i.e. des souches de *Candida albicans* associées à d'autres souches de *Candida*),  
25 et  
- le lot témoin étant constitué par ledit lait clarifié et stérilisé.

- Après centrifugation à 3500-4000 g pendant 20 minutes à RT, puis culture *in situ* à 37°C pendant 1-2h, on a constaté que le système gélifié de l'exemple 7 donnait une réaction colorée positive avec les tubes des lots A et D et ne donnait aucune réaction colorée positive avec les lots B et C et le  
30 lot témoin.

**Exemple 17**

- Un échantillon d'hémoculture (provenant d'un patient infecté) préalablement mis en contact avec de la saponine (pour lyser les érythrocytes  
35 présents) est introduit à raison de 1 à 3 ml dans un tube de centrifugation



garni du système gélifié préparé selon le procédé de l'exemple 4. On centrifuge à 3000-5000 g pendant 15 minutes à RT. Après culture *in situ* à 37°C pendant 1-2 h, on observe une réaction colorée positive dans ledit tube de centrifugation, ceci indiquant la présence de bactéries Gram-négatif dans l'hémoculture.

En variante en introduisant dans la phase de révélation ou dans l'ensemble phase de révélation/phase d'absorption un antibiotique de façon à avoir un jeu de plusieurs tubes contenant chacun un antibiotique différent, on peut apprécier la résistance des bactéries contenues dans des hémocultures vis-à-vis d'antibiotiques usuels.

#### Exemple 18

On découpe et dilacère finement de la viande boeuf. Au matériau ainsi obtenu, on ajoute du sérum physiologique et des bactéries ( $10^7$  germes/ml de souches de *Staphylococcus epidermidis*). On recueille le surnageant et l'introduit à raison de 1-2 ml dans un tube contenant le système gélifié préparé selon le procédé de l'exemple 2.

On centrifuge à 3000-5000 g pendant 15 minutes à RT culture *in situ* à 37°C pendant 24 h. On observe le changement de couleur à la partie inférieure de la phase de révélation ce qui confirme la présence de bactéries dans l'échantillon testé.

#### Exemple 19

Dans un tube en centrifugation en plastique transparent d'une hauteur de 30 mm, qui est pourvu d'un capillaire ( $\Phi = 2,2$  mm ; volume = 0,045 ml) et qui est conforme à la figure 10, on introduit successivement en centrifugeant après chaque introduction (1000-3000 g pendant 10-20 minutes à RT pour tasser chaque couche :

- 0,045 ml d'un gel G 100/milieu de culture aqueux, dans lequel G 100 est à une concentration en poids sec de 0,2 g/ml et a une granulomètre à l'état gonflé de 103-311  $\mu\text{m}$ , ce milieu contenant de la résazurine, et
- 0,5 ml d'huile de paraffine.

On introduit ensuite un échantillon d'urine d'un patient atteint d'infection urinaire provoquée par des souches d'*Escherichia coli*. Après 20 minutes à 3000-5000 g à RT on observe 1 heure après le début de la centrifugation la coloration de la caractéristique de la présence de bactéries.

La numération des bactéries est faite optiquement (spectromètre, densitomètre ou appareil de MacFARLAND destiné à la mesure de la turbidimétrie), le cas échéant avec des solutions d'urine étalon contenant chacun une quantité connue d'*Escherichia coli*.

- 5           On récupère la phase de révélation comme expliqué plus haut au moyen d'un deuxième tube de centrifugation contenant la solution aqueuse de récupération afin de réaliser des antibiogrammes pour apprécier la résistance des bactéries recueillis vis-à-vis de plusieurs antibiotiques.

- 10           On obtient des résultats particulièrement efficaces quand on diminue le volume du capillaire 7 jusqu'à 0,02-0,03  $\mu$ l.

Selon l'invention, on préconise un nécessaire, kit ou trousse de dosage qui comporte au moins

- (1) un tube de centrifugation à fond conique 6a contenant un système gélifié constitué, de haut en bas, de la phase de protection 4, la phase d'absorption 2 et de la phase de révélation 1, un tube de centrifugation à fond sphérique 6b contenant un système gélifié constitué, de haut en bas, de la phase de protection 4, de la phase d'absorption 2, de la phase de révélation et de la phase barrière 3, ou un tube de centrifugation à fond capillaire 6c contenant un système gélifié constitué de la phase de révélation sur laquelle repose, le cas échéant, la couche de protection et/ou l'ensemble couche de protection + couche d'absorption ; et/ou,
- 15           (2) des flacons contenant les matériaux constitutifs (i.e. le ou les gels, la substance particulière, la paraffine solide et/ou la paraffine liquide) desdites phases, le réactif induisant une variation de mesure optique détectable en présence de microorganismes, et le cas échéant, le milieu de culture pour le gonflement de ladite phase de révélation 1.
- 20           On préconise également l'utilisation du procédé et du système gélifié selon l'invention pour

- détecter la présence ou l'absence de bactéries dans un échantillon de sang ou d'urine, notamment dans le domaine du screening des hémocultures et du screening urinaire;
- 30           - identifier une souche de microorganisme dans un échantillon biologique en utilisant au niveau de la phase de révélation ( $\alpha$ ) un réactif induisant une variation de mesure optique détectable et ( $\beta$ ) un milieu de culture, qui sont spécifiques de ladite souche,
- 35

- procéder à la numération des microorganismes présents dans la phase de révélation,
- recueillir la phase de révélation contenant des microorganismes en vue d'étudier ces derniers, ou
- 5 - déterminer la résistance de souches de microorganismes vis-à-vis d'un ensemble d'antibiotiques usuels.

## REVENDECATIONS

- 5 1. Procédé de détection de la présence ou de l'absence de microorganismes appartenant à l'ensemble des bactéries et des levures dans un échantillon liquide (5) d'un matériau biologique susceptible de contenir des cellules autres que celles desdits microorganismes, ledit procédé, qui met en oeuvre une technique de séparation sur gel, étant caractérisé en ce qu'il
- 10 comprend les étapes consistant à :
- (1°) faire appel à un système gélifié (10) qui (i) sépare en fonction de leur taille les microorganismes, éventuellement présents dans ledit échantillon liquide (5) et qui proviennent dudit matériau biologique, des autres composants solides que peut contenir ledit échantillon
- 15 liquide, (ii) est essentiellement imperméable à l'eau pouvant être présente dans ledit échantillon liquide et aux substances dissoutes éventuellement présentes dans ledit échantillon liquide, et (iii) comporte au moins
- (a) une première phase (1), dite de révélation, qui est un gel
- 20 comportant un milieu de culture de microorganismes et un réactif induisant une variation de mesure optique détectable en présence de microorganismes, ledit gel étant un mélange intime d'eau et de particules polymériques absorbant l'eau, qui ont été gonflées de telle façon que dans ledit mélange intime lesdites particules
- 25 polymériques aient ( $\alpha$ ) une concentration en poids sec comprise entre 0,05 et 0,2 g/ml et ( $\beta$ ) un diamètre à l'état gonflé compris entre 90 et 320  $\mu$ m, l'eau dudit mélange intime provenant en totalité ou en partie dudit milieu de culture ;
- (2°) introduire ledit échantillon liquide (5) dans un tube de centrifugation (6a, 6b) au-dessus dudit système gélifié (10) préalablement disposé
- 30 dans ledit tube de centrifugation ;
- (3°) centrifuger le contenu dudit tube (6a, 6b) résultant ; et,
- (4°) révéler la présence ou l'absence de microorganismes dans ledit échantillon liquide (5) provenant dudit matériau biologique, au niveau

de ladite première phase (1) du système gélifié (10), par ledit réactif induisant une variation de mesure optique détectable.

2. Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce que la révélation de l'étape (4°) intervient après multiplication des microorganismes  
5 sur ledit milieu de culture, à une température comprise entre la température ambiante et 45°C, en au plus 24 h (de préférence en 1-2 h) pour les bactéries et en au plus 36 h (de préférence en 24-30 h) pour les levures.
3. Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce que la centrifugation de l'étape (3°) est réalisée à 1000-5000 g.
- 10 4. Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce que, à l'étape (1°), ledit système gélifié comporte en outre
  - (b) une seconde phase (2), dite d'absorption, essentiellement imperméable à l'eau pouvant être présente dans ledit échantillon liquide et aux substances qui y sont dissoutes, qui retient dans sa  
15 masse les particules non solubles contenues dans ledit échantillon liquide et ayant une taille inférieure à 5  $\mu\text{m}$  mais laisse passer les particules ayant une taille supérieure ou égale à 5  $\mu\text{m}$  lors de la centrifugation, et qui est constituée (i) d'un gel ou (ii) de particules de silice ou de silicate ayant une granulométrie inférieure à 0,1  $\mu\text{m}$ , ladite seconde phase reposant sur ladite  
20 première phase, ledit mélange intime étant essentiellement imperméable à l'eau pouvant être présente dans ledit échantillon liquide.
5. Procédé suivant la revendication 4, caractérisé en ce que ladite  
25 seconde phase (2) est un gel constitué par un mélange intime d'eau et de particules polymériques absorbant l'eau qui ont été gonflées de telle façon que dans ledit mélange intime lesdites particules polymériques aient ( $\alpha$ ) une concentration en poids sec comprise entre 0,2 et 1 g/ml et ( $\beta$ ) un diamètre à l'état gonflé compris entre 160 et 530  $\mu\text{m}$ .
- 30 6. Procédé suivant la revendication 4, caractérisé en ce que ladite seconde phase (2) est une couche constituée d'une matière minérale micronisée de façon à avoir à l'état sec une granulométrie inférieure à 0,1  $\mu\text{m}$ , d'une part, et ne gonflant essentiellement pas en présence d'eau, d'autre part.

7. Procédé suivant la revendication 6, caractérisé en ce que ladite matière minérale est choisie parmi l'ensemble constitué par la silice et les silicates, notamment le kaolin.
8. Procédé suivant la revendication 4, caractérisé en ce que ladite  
5 seconde phase (2) renferme une ou plusieurs substances (i) inhibant les éventuels contaminants, (ii) lysant les cellules et/ou (iii) éliminant les lipides, qui sont contenus dans ledit échantillon liquide (5) provenant dudit matériau biologique et susceptible d'interférer à l'étape (4°) en réagissant avec ledit réactif induisant une variation de mesure optique détectable en présence de  
10 microorganismes.
9. Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce que, à l'étape (1°), ledit système gélifié comporte en outre  
(c) une troisième phase (3), dite barrière, infranchissable lors de la centrifugation de l'étape (3°), par les microorganismes éventuel-  
15 lement présents, ladite troisième phase étant disposée sous la première phase (1) de telle façon que ladite première phase (1) repose sur ladite troisième phase (3).
10. Procédé suivant la revendication 9, caractérisé en ce que ladite troisième phase (3) est une paraffine solide fondant à une température  
20 supérieure à la température de multiplication des microorganismes.
11. Procédé suivant la revendication 9, caractérisé en ce que ladite troisième phase (3) est un gel constitué par un mélange intime d'eau et de particules polymériques absorbant l'eau, qui ont été gonflées de telle façon que dans ledit mélange intime lesdites particules polymériques aient ( $\alpha$ ) une  
25 concentration en poids sec comprise entre 0,04 et 0,2 g/ml et ( $\beta$ ) un diamètre à l'état gonflé compris entre 30 et 130  $\mu$ m.
12. Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce que, à l'étape (1°), ledit système gélifié comporte en outre  
(d) une quatrième phase (4), dite de protection, qui (i) est une huile  
30 inerte de densité inférieure à celle de l'eau, de préférence une huile de paraffine, (ii) avant centrifugation, repose sur ( $\alpha$ ) ladite première phase (1) en l'absence de la seconde phase (2), ou ( $\beta$ ) ladite seconde phase (2) quand celle-ci est présente dans ledit système gélifié (10), et (iii) après centrifugation selon l'étape (3°),  
35 repose sur l'eau dudit échantillon liquide (5).

13. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 1 et 4 à 12, caractérisé en ce que, à l'étape (1°), on fait appel

(i) à un système gélifié comprenant, de haut en bas, dans un tube de centrifugation à fond conique (6a) :

- 5 - ladite quatrième phase (4),
- ladite seconde phase (2), et
- ladite première phase (1) ;

(ii) à un système gélifié comprenant, de haut en bas, dans un tube de centrifugation à fond rond ou sphérique (6b) :

- 10 - ladite quatrième phase (4),
- ladite seconde phase (2),
- ladite première phase (1), et
- ladite troisième phase (3) ;

(iii) à un système gélifié comprenant dans un tube de centrifugation à fond pourvu d'un capillaire 6c : ladite première phase (1) sur laquelle repose, le cas échéant, ladite quatrième phase (4) et/ou ladite seconde phase (2) ; où ladite première phase (1) a un volume plus faible que ceux de ladite seconde phase (2) et dudit échantillon liquide (5) pour concentrer les microorganismes lors de la centrifugation.

20 14. Système gélifié (10) utilisable suivant le procédé de la revendication 1, ledit système gélifié, étant caractérisé en ce qu'il comporte au moins

- (a) une première phase (1), dite de révélation, qui est un gel comportant un milieu de culture de microorganismes et un réactif induisant une variation de mesure optique détectable en présence de microorganismes, ledit gel étant un mélange intime d'eau et de particules polymériques absorbant l'eau, qui ont été gonflées de telle façon que dans ledit mélange intime lesdites particules polymériques aient ( $\alpha$ ) une concentration en poids sec comprise entre 0,05 et 0,2 g/ml et ( $\beta$ ) un diamètre à l'état gonflé compris entre 90 et 320  $\mu$ m, l'eau dudit mélange intime provenant en totalité ou en partie dudit milieu de culture.

15. Système gélifié suivant la revendication 14, caractérisé en ce qu'il comporte en outre

- (b) une seconde phase (2), dite d'absorption, essentiellement imperméable à l'eau pouvant être présente dans ledit échantillon liquide et aux substances qui y sont dissoutes, qui retient dans sa masse les particules non solubles contenues dans ledit échantillon liquide et ayant une taille inférieure à 5  $\mu\text{m}$  mais laisse passer les particules ayant une taille supérieure ou égale à 5  $\mu\text{m}$  lors de la centrifugation, et qui est constituée (i) d'un gel ou (ii) de particules de silice ou de silicate ayant une granulométrie inférieure à 0,1  $\mu\text{m}$ , ladite seconde phase reposant sur ladite première phase, ledit mélange intime étant essentiellement imperméable à l'eau pouvant être présente dans ledit échantillon liquide.
16. Système gélifié suivant la revendication 15, caractérisé en ce que ladite seconde phase 2 est un gel constitué par un mélange intime d'eau et de particules polymériques absorbant l'eau qui ont été gonflées de telle façon que dans ledit mélange intime lesdites particules polymériques aient ( $\alpha$ ) une concentration en poids sec comprise entre 0,2 et 1 g/ml et ( $\beta$ ) un diamètre à l'état gonflé compris entre 160 et 530  $\mu\text{m}$ .
17. Système gélifié suivant la revendication 15, caractérisé en ce que ladite seconde phase 2 est une couche constituée d'une matière minérale micronisée de façon à avoir à l'état sec une granulométrie inférieure à 0,1  $\mu\text{m}$ , d'une part, et ne gonflant essentiellement pas en présence d'eau, d'autre part.
18. Système gélifié suivant la revendication 14, caractérisé en ce qu'il comporte en outre
- (c) une troisième phase (3), dite barrière, infranchissable après centrifugation, par les microorganismes éventuellement présents, ladite troisième phase étant disposée sous la première phase (1) de telle façon que ladite première phase (1) repose sur ladite troisième phase (3).
19. Système gélifié suivant la revendication 18, caractérisé en ce que ladite troisième phase (3) est une paraffine solide fondant à une température supérieure à la température de multiplication des microorganismes.
20. Système gélifié suivant la revendication 18, caractérisé en ce que ladite troisième phase est un gel constitué par un mélange intime d'eau et de



particules polymériques absorbant l'eau, qui ont été gonflées de telle façon que dans ledit mélange intime lesdites particules polymériques aient ( $\alpha$ ) une concentration en poids sec comprise entre 0,04 et 0,2 g/ml et ( $\beta$ ) un diamètre à l'état gonflé compris entre 30 et 130  $\mu\text{m}$ .

- 5 21. Système gélifié suivant la revendication 18, caractérisé en ce qu'il comporte en outre

10 (d) une quatrième phase (4), dite de protection, qui (i) est une huile inerte de densité inférieure à celle de l'eau, de préférence une huile de paraffine, (ii) avant centrifugation, repose sur ( $\alpha$ ) ladite première phase (1) en l'absence de la seconde phase (2), ou ( $\beta$ ) ladite seconde phase (2) quand celle-ci est présente dans ledit système gélifié (10), et (iii) après centrifugation, repose sur l'eau dudit échantillon liquide (5).

- 15 22. Tube de centrifugation pourvu à son fond d'un capillaire, utile pour mettre en oeuvre le procédé suivant l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisé en ce que ledit tube comporte une surface interne tronconique 20 reliant la partie cylindrique du tube au capillaire, l'angle  $\alpha$  du cône étant inférieur à  $30^\circ$ , et en ce que la phase de révélation est logée dans la totalité du capillaire (7).

- 20 23. Tube de centrifugation selon la revendication 22 permettant la numération des bactéries présentes dans la phase de révélation et/ou la récupération de ladite phase de révélation.

- 25 24. Nécessaire de dosage, utile dans la mise en oeuvre du procédé suivant l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisé en ce qu'il comporte

(A) au moins un tube de centrifugation à fond conique (6a) contenant un système gélifié constitué, de haut en bas, de la phase de protection (4), la phase d'absorption (2) et de la phase de révélation (1), un tube de centrifugation à fond sphérique (6b) contenant un système gélifié constitué, de haut en bas, de la phase de protection (4), de la phase d'absorption (2), de la phase de révélation (1) et de la phase barrière (3), ou un tube de centrifugation pourvu à son fond d'un capillaire 6c contenant un système gélifié constitué de la phase de révélation (1) logée dans le capillaire (7), une phase de protection (4) et/ou une phase d'absorption (2) reposant sur ladite phase de révélation (1) ; et/ou

35

(B) des flacons contenant les matériaux constitutifs desdites phases, le réactif induisant une variation de mesure optique détectable en présence de microorganismes, et au moins le milieu de culture pour le gonflement de ladite phase de révélation (1).

- 5 25. Utilisation du procédé suivant l'une quelconque des revendications 1 à 13, ladite utilisation étant caractérisée en ce qu'elle comprend
- la détection de la présence ou de l'absence de bactéries dans un échantillon de sang ou d'urine, notamment dans le domaine du screening des hémocultures et du screening urinaire ;
  - 10 - l'identification d'une souche de microorganisme dans un échantillon biologique en utilisant au niveau de la phase de révélation ( $\alpha$ ) un réactif induisant une variation de mesure optique détectable et ( $\beta$ ) un milieu de culture, qui sont spécifiques de ladite souche,
  - la numération des microorganismes présents dans la phase de
  - 15 révélation,
  - le recueil de la phase de révélation contenant des microorganismes en vue d'étudier ces derniers, ou
  - déterminer la résistance de souches de microorganismes vis-à-vis d'un ensemble d'antibiotiques usuels.

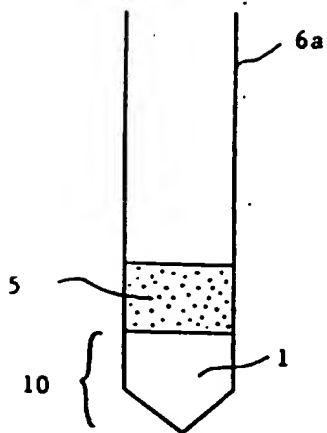


Fig. 1

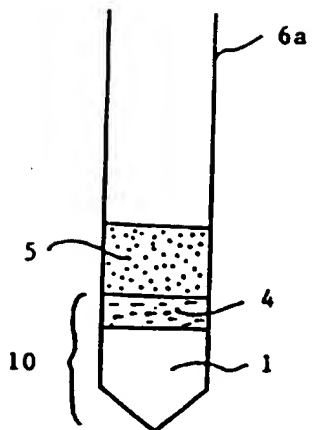


Fig. 2a

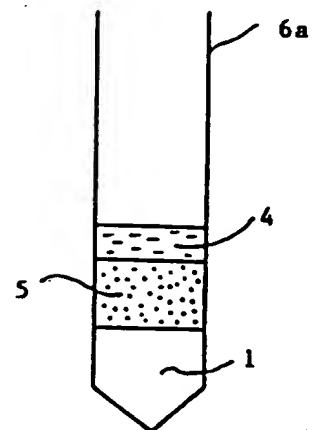


Fig. 2b

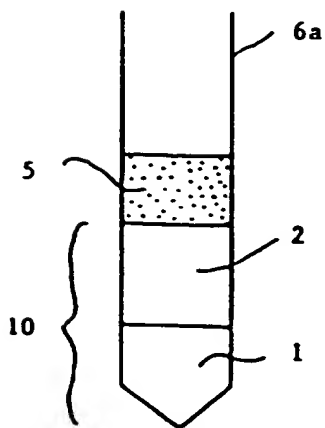


Fig. 3

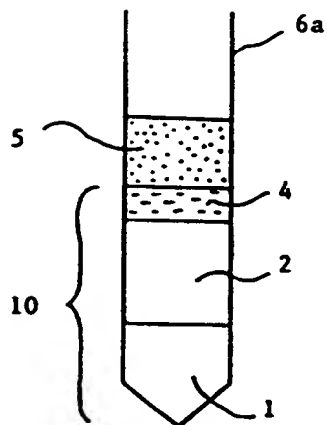


Fig. 4a

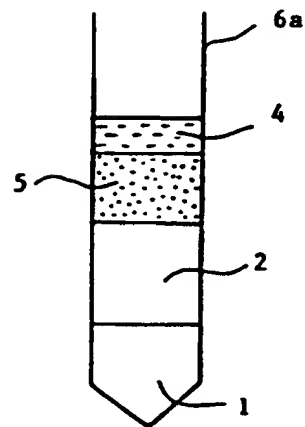


Fig. 4b

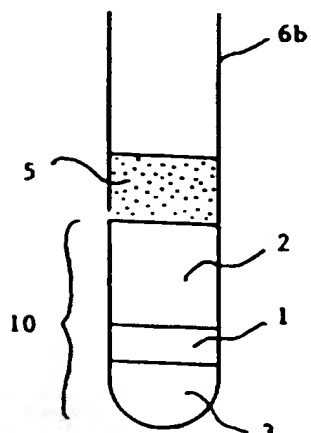


Fig. 5

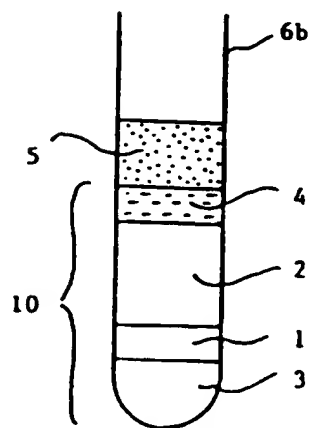


Fig. 6a

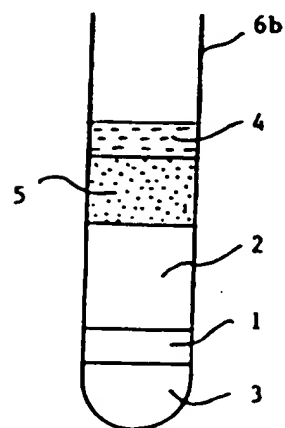


Fig. 6b

2/3

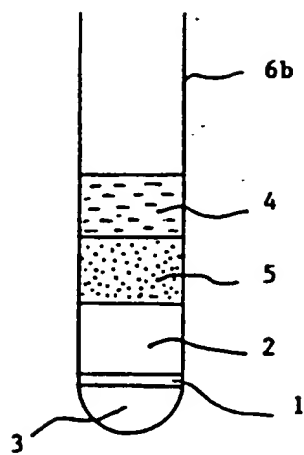


Figure 8

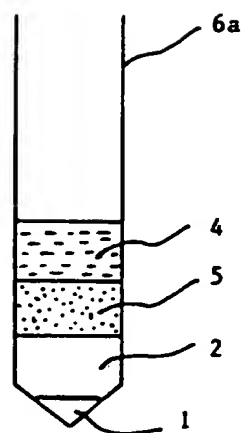


Figure 7

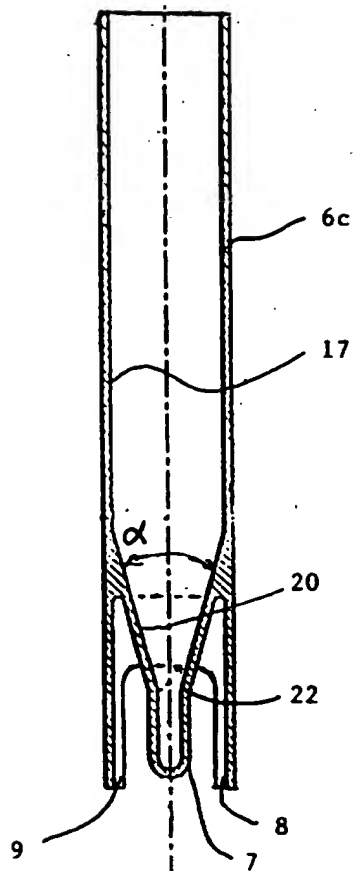
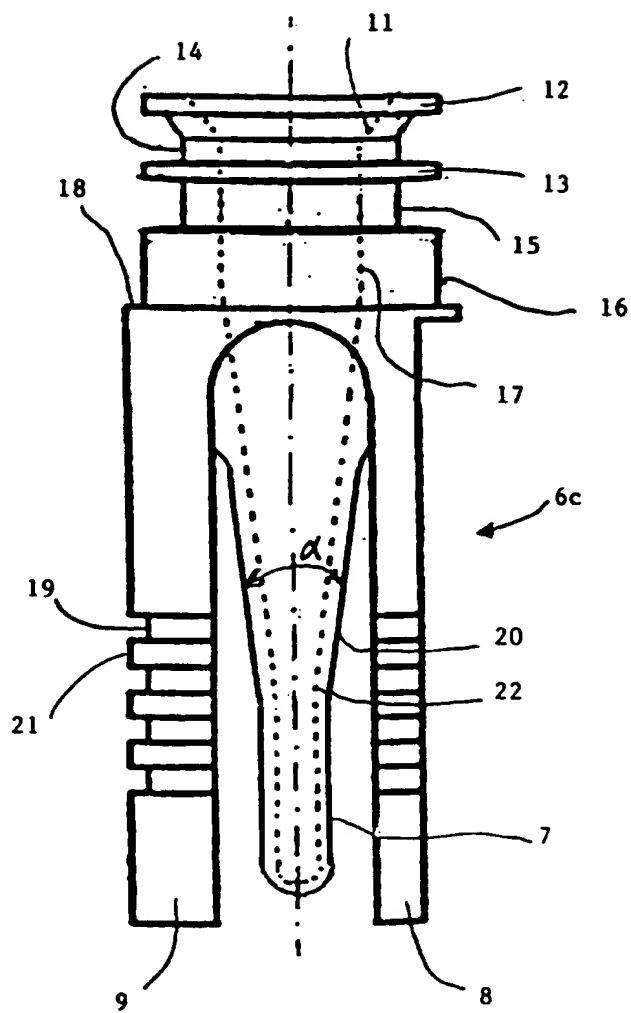


Fig. 9

Fig. 10



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PL./FR 96/00419

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 C12Q1/04 C12Q1/24

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO,A,91 04318 (TRANCEL CORPORATION) 4 April 1991 see the whole document ---	1-25
A	US,A,4 212 948 (G. L. DORN) 15 July 1980 see the whole document ---	1-25
A	US,A,3 932 222 (G. L. DORN) 13 January 1976 see the whole document ---	1-25
A	US,A,4 164 449 (G. L. DORN ET AL.) 14 August 1979 see the whole document ---	1-25
A	US,A,4 190 328 (R. A. LEVINE ET AL.) 26 February 1980 see the whole document ---	1-25
-/--		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- \*A\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 July 1996

Date of mailing of the international search report

06.08.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Griffith, G

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PL./FR 96/00419

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US,A,4 717 660 (T. H. SCHULTE) 5 January 1988 see the whole document ---	1-25
A	EP,A,0 454 509 (CENTRE REGIONAL DE TRANSFUSION SANGUINE DE LILLE) 30 October 1991 cited in the application -----	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PL./FR 96/00419

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9104318	04-04-91	AT-T- 140033 AU-B- 6517890 CA-A- 2066761 EP-A- 0578631 JP-T- 6503466	15-07-96 18-04-91 21-03-91 19-01-94 21-04-94
US-A-4212948	15-07-80	NONE	
US-A-3932222	13-01-76	AU-B- 502406 AU-B- 8442675 CA-A- 1028284 DE-A- 2537013 FR-A,B 2294745 GB-A- 1482862 JP-C- 1169759 JP-A- 51073116 JP-B- 58004554	26-07-79 10-03-77 21-03-78 24-06-76 16-07-76 17-08-77 17-10-83 24-06-76 26-01-83
US-A-4164449	14-08-79	NONE	
US-A-4190328	26-02-80	AT-T- 9116 EP-A- 0012287	15-09-84 25-06-80
US-A-4717660	05-01-88	NONE	
EP-A-454509	30-10-91	FR-A- 2660437 AT-T- 139847	04-10-91 15-07-96



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. <sup>te</sup> Internationale No

PC1/FR 96/00419

**A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE**  
CIB 6 C12Q1/04 C12Q1/24

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

**B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE**

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

**C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO,A,91 04318 (TRANCEL CORPORATION) 4 Avril 1991 voir le document en entier ---	1-25
A	US,A,4 212 948 (G. L. DORN) 15 Juillet 1980 voir le document en entier ---	1-25
A	US,A,3 932 222 (G. L. DORN) 13 Janvier 1976 voir le document en entier ---	1-25
A	US,A,4 164 449 (G. L. DORN ET AL.) 14 Août 1979 voir le document en entier ---	1-25
	-/--	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cite pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*A\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

18 Juillet 1996

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

06.08.96

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office European des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (- 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (- 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Griffith, G

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No  
PL./FR 96/00419

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	US,A,4 190 328 (R. A. LEVINE ET AL.) 26 Février 1980 voir le document en entier ---	1-25
A	US,A,4 717 660 (T. H. SCHULTE) 5 Janvier 1988 voir le document en entier ---	1-25
A	EP,A,0 454 509 (CENTRE REGIONAL DE TRANSFUSION SANGUINE DE LILLE) 30 Octobre 1991 cité dans la demande -----	

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Document International No

PL /FR 96/00419

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9104318	04-04-91	AT-T- 140033	15-07-96
		AU-B- 6517890	18-04-91
		CA-A- 2066761	21-03-91
		EP-A- 0578631	19-01-94
		JP-T- 6503466	21-04-94
-----			
US-A-4212948	15-07-80	AUCUN	
-----			
US-A-3932222	13-01-76	AU-B- 502406	26-07-79
		AU-B- 8442675	10-03-77
		CA-A- 1028284	21-03-78
		DE-A- 2537013	24-06-76
		FR-A,B 2294745	16-07-76
		GB-A- 1482862	17-08-77
		JP-C- 1169759	17-10-83
		JP-A- 51073116	24-06-76
		JP-B- 58004554	26-01-83
-----			
US-A-4164449	14-08-79	AUCUN	
-----			
US-A-4190328	26-02-80	AT-T- 9116	15-09-84
		EP-A- 0012287	25-06-80
-----			
US-A-4717660	05-01-88	AUCUN	
-----			
EP-A-454509	30-10-91	FR-A- 2660437	04-10-91
		AT-T- 139847	15-07-96
-----			